

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Biologie

Buněčná a vývojová biologie – fyziologie buňky



Bc. Zuzana Ezrová

Molekulární mechanismy zabíjení buněk nádoru slinivky břišní

Molecular mechanisms of cell death induction in pancreatic cancer cells

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: prof. Ing. Jiří Neužil, CSc.

Konzultant: Mgr. Štěpána Boukalová, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 25. 4. 2016

.....
Podpis

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Ing. prof. Jiřímu Neužilovi, CSc. za odborné vedení této práce, velmi vstřícný přístup, trpělivost a podnětné připomínky. Rovněž děkuji své konzultantce Mgr. Štěpáně Boukalové, Ph.D. za odborné metodické vedení, ochotu a pomoc při laboratorních experimentech, jejich vyhodnocování i při sepisování této práce. Chtěla bych také poděkovat Ing. Janu Štursovi, Ph.D. a Ing. Lukáši Wernerovi, Ph.D., kteří připravují mitochondriálně cílené látky, jež naše laboratoř využívá, a také všem svým kolegům z Laboratoře molekulární terapie za podporu, cenné rady a za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě velmi děkuji své rodině a přátelům za všestrannou podporu během studia.

Abstrakt

Jedním z nejobtížněji léčitelných typů nádorů je rakovina slinivky břišní, k jejíž léčbě jsou dosud užívané klasické terapie zcela nedostatečné. Přesto zatím nebyl zaznamenán žádný významný pokrok v zavedení nových terapeutických přístupů, a tak toto onemocnění zůstává jednou z nejčastějších příčin úmrtí na rakovinu. V současné době mnohé vědecké práce odkazují na potenciální využití metforminu, látky ze skupiny biguanidů nejčastěji užívané k léčbě diabetu druhého typu. Metformin snižuje dle retrospektivních studií riziko výskytu rakoviny pankreatu u diabetiků, a to pravděpodobně interakcí s komplexem I dýchacího řetězce. Laboratorní výzkumy ovšem evidují protinádorové účinky této látky až na hranici fyziologických koncentrací, jež jsou u pacientů jen velmi obtížně dosažitelné.

Vzhledem k narůstajícímu množství důkazů nepostradatelnosti funkčních mitochondrií v iniciaci i rozvoji maligních novotvarů jsme proto ve spolupráci s dalšími výzkumnými institucemi modifikovali metformin tak, aby byla posílena jeho akumulace v mitochondriích. Očekávali jsme, že mitochondriálně cílený metformin, norMitoMet, se bude vyznačovat výrazně zvýšenou účinností v porovnání s mateřskou látkou. Tato práce je zaměřena na objasnění mechanismu působení obou látek na pankreatické rakovinné buňky *in vitro* za využití pankreatické rakovinné linie PANC-1 a nerakovinných fibroblastů BJ, a rovněž *in vivo*, za použití experimentálního myšího modelu. Důraz je kladen především na signalizační dráhy vedoucí k buněčné smrti a ovlivnění mitochondriální funkce, jež se jeví jako nezbytná především pro mnohdy chemorezistentní rakovinné kmenové buňky. Výsledky potvrzují vyšší účinnost látky norMitoMet v porovnání s metforminem jak ve schopnosti zabíjet pankreatické rakovinné buňky a potlačovat růst nádorů, tak i ve schopnosti zasahovat do buněčného metabolismu prostřednictvím inhibice mitochondriální respirace či narušení redoxní signalizace. norMitoMet se tak ukazuje jako nová velmi nadějná látka, která by mohla zlepšit jinak velmi špatné vyhlídky pacientů s rakovinou slinivky břišní.

Klíčová slova

Rakovina slinivky břišní, mitochondrie, mitokany, metformin, norMitoMet, komplex I respiračního řetězce, oxidativní stress.

Abstract

Pancreatic adenocarcinoma is one of the most challenging types of tumours to treat; furthermore, standard therapies used so far turn out to be highly inadequate in its treatment. There has been no significant progress in the introduction of new therapeutic approaches to date, and so this disease remains one of the most common causes of death from cancer. Currently, many scientific papers refer to the potential use of metformin, the substance of the biguanide class most commonly used to treat diabetes mellitus type 2. Metformin, according to retrospective studies, reduces the risk of pancreatic cancer in diabetics, possibly by interacting with the complex I of electron transport chain. However, laboratory research registered neoplastic activity of this compound at super-physiological concentrations that are very difficult to achieve in patients.

Due to the growing body of evidence of indispensability of functional mitochondria in the initiation and development of malignant neoplasms, we have, in collaboration with other researchers, modified metformin to strengthen its accumulation in mitochondria. We expected that mitochondrially targeted metformin, norMitoMet, will be considerably more efficiency in comparison with the parental compound. The main focus of this study is to shed light on the understanding of the mechanism of action of both substances on pancreatic cancer cells *in vitro* using PANC-1 pancreatic cancer cell line and non-cancer BJ fibroblasts, as well as *in vivo*, utilizing an experimental mouse model. The focus is on the signalling pathways leading to cell death and the effect on mitochondrial function, which appears to be important for chemoresistant cancer stem cells. The results confirm the superior efficacy of norMitoMet compared to metformin in the ability to kill pancreatic cancer cells and suppress tumour growth as well as in the ability to intervene in cellular metabolism by inhibiting mitochondrial respiration or distortion of redox signalling. norMitoMet thus appears as a very promising new agent that could improve an otherwise very poor prospects of patients with pancreatic cancer.

Key words: pancreatic cancer, mitochondria, mitocans, metformin, norMitoMet, respiratory complex I, oxidative stress.

Obsah

| | |
|---|----|
| Seznam zkratk | 8 |
| 1 Úvod..... | 10 |
| 2 Literární přehled | 11 |
| 2.1 Rakovina slinivky břišní | 11 |
| 2.1.1 Diabetes mellitus 2. typu a rakovina pankreatu | 12 |
| 2.1.2 Biologie rakoviny slinivky břišní | 13 |
| 2.1.3 Léčebné strategie | 17 |
| 2.2 Mitochondrie a mitochondriální funkce | 19 |
| 2.3 Stavba mitochondrií | 19 |
| 2.4 Komplexy oxidativní fosforylace..... | 20 |
| 2.4.1 Elektronový transportní řetězec | 20 |
| 2.4.2 Komplex I (NADH:ubichinon oxidoreduktáza) | 21 |
| 2.4.3 Komplex II (sukcinát:ubichinon oxidoreduktáza) | 22 |
| 2.4.4 Komplex III (koenzym Q:cytochrom c oxidoreduktáza)..... | 22 |
| 2.4.5 Komplex IV (cytochrom c oxidáza) | 23 |
| 2.4.6 Komplex V (F ₁ F ₀ -ATP syntáza) | 23 |
| 2.4.7 Mitochondriální superkomplexy | 24 |
| 2.5 Úloha mitochondrií v rakovině | 26 |
| 2.5.1 Energetický metabolismus rakovinných buněk | 26 |
| 2.5.2 Deregulace signálů řídících růst a dělení buněk i buněčnou smrt | 28 |
| 2.5.3 Únik odpovědi imunitního systému | 29 |
| 2.5.4 Angiogeneze, infiltrace tkání a metastáze | 29 |
| 2.6 Mitochondrie jako cíl léčby nádorových onemocnění | 30 |
| 2.6.1 Mitokany interagující s komplexy dýchacího řetězce | 32 |
| 2.6.2 Biguanidy | 32 |
| 3 Cíle práce | 36 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4 | Metody | 37 |
| 4.1 | Kultivace buněk | 37 |
| 4.2 | Trypsinizace | 37 |
| 4.3 | Detekce buněčné smrti | 37 |
| 4.4 | Detekce produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS)..... | 38 |
| 4.5 | Detekce změny mitochondriálního membránového potenciálu | 39 |
| 4.6 | Měření respirace..... | 39 |
| 4.6.1 | Měření respirace na intaktních buňkách | 40 |
| 4.6.2 | Měření respirace na permeabilizovaných buňkách..... | 41 |
| 4.7 | Experimentální zvířecí model | 42 |
| 4.8 | Vyhodnocování výsledků a statistická analýza..... | 42 |
| 5 | Výsledky | 43 |
| 5.1 | Navození buněčné smrti | 44 |
| 5.2 | Tvorba reaktivních forem kyslíku a dusíku | 46 |
| 5.3 | Změna mitochondriálního membránového potenciálu ($\Delta\Psi_m$) | 48 |
| 5.4 | Respirace intaktních buněk | 49 |
| 5.5 | Respirace permeabilizovaných buněk..... | 50 |
| 5.6 | Sledování růstu nádorů pomocí experimentálního myšího modelu | 51 |
| 6 | Diskuze | 53 |
| 7 | Závěr | 58 |
| 8 | Seznam použité literatury | 59 |

Seznam zkratek

| | |
|---------------------|--|
| AIF | „apoptosis inducing factor“ |
| ALDH | „aldehyde dehydrogenase“ |
| AMP | „adenosine monophosphate“ |
| ATP | „adenosine triphosphate“ |
| AMPK | „AMP-activated protein kinase“ |
| ANT | „ATP/ADP translocase“ |
| α -TOS | „alpha-tocopheryl succinate“ |
| Bcl-2 | „B cell lymphoma 2“ |
| Bh3 | „Bcl-2 homology domain 3“ |
| BMI | „body mass index“ |
| CCCP | „carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone“ |
| Rons | „reactive oxygen and nitrogen species“ |
| CD | „cluster of differentiation“ |
| CKN2A | „cyclin dependent kinase inhibitor 2A“ |
| c-MET | „MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase“ |
| CoQ | „Coenzym Q“ |
| COX | „cytochrome c oxidase“ |
| CXCR4 | „chemokine receptor type 4“ |
| DM2 | „diabetes mellitus type 2“ |
| ECM | „extracellular matrix“ |
| EGF | „epidermal growth factor“ |
| EMT | „epithelial-mesenchymal transition“ |
| ERK | „extracellular signal-regulated kinases“ |
| ETC | „electron transport chain“ |
| GSAO | „4-(N-(S-glutathionylacetyl)amino)phenylarsenoxid“ |
| GTP | „guanosine triphosphate“ |
| HIF-1 | „hypoxia induced factor 1“ |
| HK | „hexokinase“ |
| HSP | „heat shock protein“ |
| IF-1 | „inhibitory factor 1“ |
| IGF-1 | „insulin growth factor 1“ |
| IMM | „inner mitochondrial membrane“ |
| IMS | „intermembrane space“ |
| KRAS | „kirsten rat sarcoma“ |
| LDHA 1X | „lactate dehydrogenase“ |
| LKB1 | „liver kinase B1“ |
| MitoE | „mitochondrially targeted vitamin E“ |
| MitoMet | „mitochondrially targeted metformin“ |
| MitoQ | „mitochondrially targeted ubiquinone“ |
| MitoVES | „mitochondrially targeted vitamin E succinate“ |
| MMP | „mitochondrial membrane potential“ |

MiRNA„microRNA“
 mtDNA.....„mitochondrial DNA“
 mTOR„mammalian target of rapamycin“
 NADH.....„nicotinamide adenine dinucleotide“
 NADPH.....„nicotinamide adenine dinucleotide phosphate“
 NK.....„natural killer“
 NF- κ B„nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells“
 Notch.....„neurogenic locus notch homolog protein“
 OMM„outer mitochondrial membrane“
 OXPHOS„oxidative phosphorylation“
 PanIN„pancreatic intraepithelial neoplasia“
 PDAC.....„pancreatic ductal adenocarcinoma“
 PI3K„phosphatidyl-inositol-3-kinase“
 PS„phosphatidyl serine“
 ROS.....„reactive oxygen species“
 Shh„sonic hedgehog“
 SMAD4.....„mothers against decapentaplegic homolog 4“
 TGF β„tumor growth factor“
 TICs„tumor initiating cells“
 TP53.....„tumor supressor protein 53“
 TPP⁺„triphenylphosphonium“
 TSC2„tuberous Sclerosis Complex 2“
 VDAC„voltage dependent anion channel“
 Wnt.....„int/wingless“

1 Úvod

Rakovina slinivky břišní je jednou z nejčastějších příčin úmrtí na rakovinu, přesto dosud nebyla vyvinuta terapie, která by zvyšovala šance postižených pacientů na přežití. Nadějnou látkou, jejíž protirakovinné účinky jsou nyní testovány v rámci klinických studií, je metformin, antidiabetikum ze skupiny biguanidů užívaných u pacientů s cukrovkou druhého typu (Gandini et al., 2014). Retrospektivní studie ukazují, že terapie metforminem je spojena se sníženým vznikem karcinomu pankreatu a delší dobou přežití u pacientů s touto chorobou (Gandini et al., 2014; Chae et al., 2016). Ačkoliv mechanismus působení metforminu není dosud zcela objasněn, za hlavní cíl této látky je považován komplex I mitochondriálního elektronového transportního řetězce (El-Mir, 2000).

Mitochondrie hrají zásadní roli v životě buňky i její smrti. Avšak až během posledních let se tyto organely začaly dávat do významné souvislosti také s nádorovým bujením. S odhalením potenciální závislosti rakovinných kmenových buněk na mitochondriálním metabolismu již nebylo možné důležitost mitochondrií v rakovině dále opomíjet (Sancho et al., 2015; Viale et al., 2014). Díky tomu se mitochondrie staly novým molekulárním zásahovým místem řady protirakovinných látek, které naše laboratoř charakterizovala jako tzv mitokany, z nichž některé, včetně metforminu, se začínají testovat i v klinicky relevantních situacích (Chae et al., 2016; Neužil et al., 2013).

Ve spolupráci s dalšími výzkumnými institucemi jsme proto připravili metformin modifikovaný tak, aby byla posílena jeho akumulace v mitochondriích. Inhibice komplexu I metforminem vede dle *in vitro* studií k významnému snížení životaschopnosti nádorových buněk, a to včetně jejich kmenových subpopulací, patrně změnou poměru koncentrace AMP a ATP v buňce, vlivem které dochází k přepnutí mezi buněčnými pochody, které ATP spotřebovávají, a pochody, které jej naopak produkují. Je ovšem velmi pravděpodobné, že mechanismus účinku metforminu je zprostředkován i jinými signalizačními dráhami, jež proces nádorové transformace ovlivňují (El-Mir, 2000; Lonardo et al., 2013). Tato práce je tudíž zaměřena na identifikaci mechanismu působení metforminu a především jeho odvozené mitochondriálně cílené látky, sloučeniny norMitoMet, na buňky rakoviny slinivky břišní, a jejich možné terapeutické využití. Předpokládáme, že mitochondriálně cílený metformin se bude vyznačovat vyšší účinností v porovnání s mateřskou látkou, a poskytne tak příležitost pro zlepšení jinak velmi nepříznivých prognóz pacientů s rakovinou pankreatu.

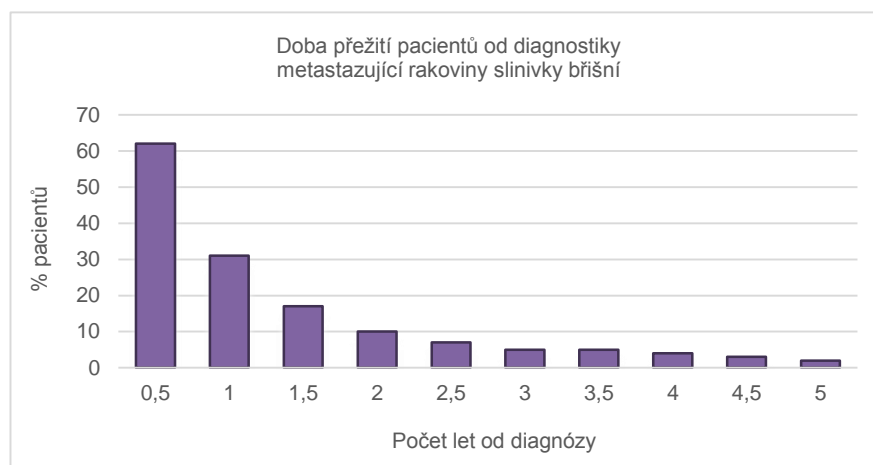
2 Literární přehled

2.1 Rakovina slinivky břišní

Pojem rakovina vystihuje genetické a metabolické onemocnění charakteristické tvorbou zhoubných novotvarů, jež vznikají jako dopad děje zvaného maligní transformace. Tato nádorová přeměna je v současnosti popisována osmi základními principy: soběstačností v růstové signalizaci; vyhýbáním se signálům, které růst inhibují; schopností infiltrovat tkáně a tvořit metastáze; získáním neomezeného replikačního potenciálu; tvorbou nových cév; odoláváním buněčné smrti; deregulací energetického metabolismu a ovlivněním imunitní odpovědi. Výše jmenované procesy se mohou projevit, dále se stupňovat a vést až ke zhoubnému bujení díky genetické nestabilitě a hromadění mutací v genomu buňky (Hanahan a Weinberg, 2011).

Ačkoliv rakovina slinivky břišní nepatří mezi nejčastěji se vyskytující nádorová onemocnění, je mezi nimi čtvrtou nejčastější příčinou úmrtí. Podle odhadů se situace bude i nadále znatelně zhoršovat a rakovina pankreatu může být spolu s rakovinou plic dokonce nádorovým onemocněním s nevyšším počtem úmrtí (Ma et al., 2013; Rahib et al., 2014). Přes hrozivou prognózu, kdy se pouze zhruba 6% pacientů dožívá alespoň 5 let od diagnostikování, a přes strmý vývoj znalostí o principech tohoto onemocnění během posledních let se stále nedaří nalézt dostatečně účinné terapeutické nástroje (Siegel et al., 2016). Zákeřnost rakoviny pankreatu spočívá především v téměř asymptomatickém průběhu onemocnění v časných fázích, eventuálně se mohou objevit poměrně nespecifické žaludeční obtíže, bolest břišní dutiny a zad, nechutenství a úbytek hmotnosti (Hamilton et al., 2000). Až 10% případů rakoviny slinivky břišní může být zapříčiněno dědičnými predispozicemi. I tak je ale velmi obtížné objevit onemocnění včas, jelikož je dosud známo jen málo specifických povrchových proteinů pankreatických rakovinných buněk, které by bylo možné použít pro detekci v séru, třebaže nedávno byly odhaleny některé nové a značně perspektivní diagnostické markery (Ansari et al., 2011; Slater et al., 2013). U většiny pacientů tak dochází k diagnostice až v příliš pokročilém stadiu (Obr. 1, s. 12), kdy nádor již nelze operovat a může tvořit metastáze, zpravidla v játrech nebo plicích, méně obvykle také v nadledvinách, ledvinách nebo kostní tkáni (Hamilton et al., 2000). Ovšem ani v případě včas vykonané a úspěšné resekce nádoru nejsou šance na přežití příliš velké, neboť pankreatické rakovinné buňky jsou neobvykle agresivní a velmi odolné vůči

chemoterapeutikům, proto jsou recidivy rakoviny poměrně běžné a asi 80% případů z nich končí smrtí pacienta (Saif, 2007; Siegel et al., 2016).



Obr. 1: Doba přežití skupiny 881 pacientů diagnostikovaných s metastazující rakovinou slinivky břišní v léčebných centrech USA (Cancer Treatment Centers of America) mezi lety 2001-2011. Upraveno dle: <http://www.cancercenter.com/PANC-1reatic-cancer/statistics/tab/PANC-1reatic-cancer-survival-statistics/>.

Mezi rizikové faktory se řadí kouření tabákových výrobků, které dle statistických analýz zvyšuje pravděpodobnost vzniku maligního nádoru o 75% v porovnání s nekuřáky. K rizikovým faktorům patří také silná konzumace alkoholu či chronický zánět slinivky břišní (Iodice et al., 2008; Wang et al., 2016). Významnou roli hraje nepochybně i obezita, konkrétně u lidí s indexem tělesné hmotnosti BMI>30 byl zaznamenán nárůst rizika rozšíření rakoviny pankreatu bezmála o polovinu (Genkinger et al., 2011). Obezita je navíc zároveň spolu s celkově nezdravým životním stylem a genetickými faktory jedním z hlavních předpokladů pro rozvoj diabetes mellitus 2. typu (DM2).

2.1.1 Diabetes mellitus 2. typu a rakovina pankreatu

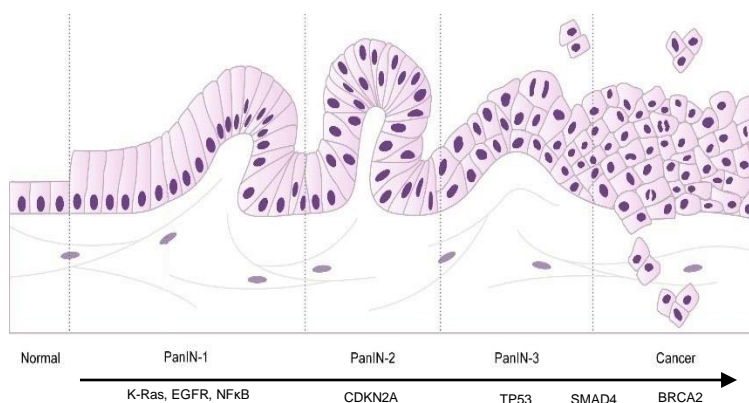
DM2, metabolické onemocnění objevující se v dospělosti, je charakterizováno vysokou hladinou glukózy v krvi, tzv. hyperglykemií, a s ní související inzulínovou rezistencí, která vede v důsledku neschopnosti buněk reagovat na normální hladinu růstového hormonu inzulínu k jeho nadměrné produkci pankreatickými β -buněkami (Dasu et al., 2008). Inzulín řídí vstřebávání glukózy z krve a dále podporuje dělení buněk a signalizační dráhy dalších růstových faktorů, například faktor IGF-1, a naopak tlumí pro-apoptotickou signalizaci. Všechny tyto procesy, které jsou u diabetiků ještě posíleny, tak mohou významně napomáhat nádorovému bujení (Ding et al., 2000; Draznin, 2011). A právě u rakoviny pankreatu byl oproti

ostatním nádorovým onemocněním zaznamenán mnohem vyšší současný výskyt diabetu (Aggarwal et al., 2013).

Spojitost mezi oběma onemocněními může být mimo jiné založena na funkci zmiňovaného IGF-1 faktoru, jehož aktivita je stimulována v nepřítomnosti vlastního inhibičního vazebného proteinu, který je regulován právě inzulinem. V konečném důsledku je pak zesílena signalizace fosfatidyl-inositol-3-kináz (PI3K) a kináz regulovaných extracelulárními signály (ERK) (Powell et al., 1991). Dráhu PI3K podporuje rovněž leptin, jenž je v nadbytku přítomný především u obézních lidí a diabetiků. Kromě toho je pro DM2 typická snížená hladina adiponektinu, čehož mohou nádorové buňky využívat pro tvorbu nových cév a vyvolání zánětlivé odpovědi imunitního systému, které jinak tento hormon potlačuje (Bao et al., 2013). Existují také studie dokládající, že rakovina slinivky břišní je i možnou příčinou pro vznik diabetu. DM2 lze tedy považovat jak za rizikový faktor rakoviny slinivky břišní, tak i za její následek (Ben et al., 2011). Ačkoliv přesný vztah mezi oběma chorobami je stále předmětem diskuzí, již několik let je nicméně potvrzován výzkumy, které prokazují, že pacienti s DM2 mají zhruba o polovinu vyšší pravděpodobnost rozvoje rakoviny pankreatu (Huxley et al., 2005; Shen et al., 2016).

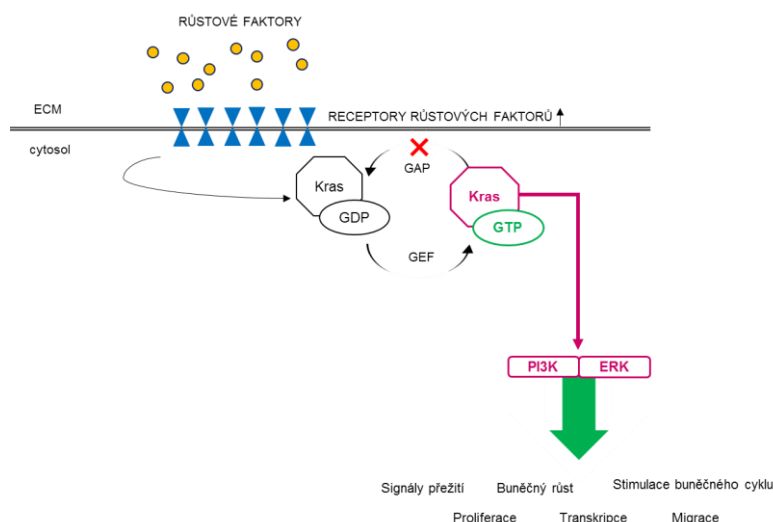
2.1.2 Biologie rakoviny slinivky břišní

Nejběžnější formou rakoviny slinivky břišní (~90% všech případů) je adenokarcinom její exokrinní části (PDAC), hlavního pankreatického vývodu *ductus pancreaticus*, kterým jsou transportovány trávicí enzymy a pankreatické šťávy a jenž se spojuje s hlavním žlučovodem ústícím do dvanáctníku tenkého střeva (Hamilton et al., 2000). Zpravidla v této oblasti dochází k tvorbě nezhoubných lézí - nejčastěji to jsou intraepiteliální neoplazie. Méně často zde vznikají papilární léze, které jsou asociovány s příznivější prognózou, zřejmě z důvodu nižšího výskytu mutace lidského homologu virového onkogenu *KRAS* a mukózní cysty (Schönleben et al., 2007). Postupným hromaděním mutací se tyto léze vyvíjí do pokročilejších stadií PanIN-3 (Obr. 2, s. 14), které se vyznačují morfologickou deformací a tvorbou vícebuněčných lokálních shluků vedoucích k tvorbě PDAC (Hruban et al., 1999). U pacientů s PDAC jsou nejčastěji pozorovány mutace v genech *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53* a *SMAD4*, třebaže genetickou analýzou bylo průměrně zaznamenáno více než 60 různých mutací ovlivňujících 12 signalizačních drah, což prokazuje nesmírnou komplexitu tohoto onemocnění (Jones et al., 2008).



Obr. 2: Rozvoj adenokarcinomu pankreatu z počátečních PanIN-1 lézí (intraepiteliální neoplazie) až do pokročilejších stadií (PanIN-3). K-Ras (lidský homolog virového onkogenu K-Ras, z angl. *Kirsten rat sarcoma*), EGFR (receptor epidermálního růstového faktoru), NF-κB (jaderný faktor κB), CDKN2A (inhibitor cyklin dependentní kinázy 2A), TP53 (tumor supresor p53), SMAD4 (tumor supresor, z angl. *mothers against decapentaplegic homolog 4*), BRCA2 (tumor supresor, z angl. *breast cancer 2*).

Aktivující bodová mutace *KRAS* genu způsobená záměnou aminokyseliny glycinu za aspartát je patrně první událostí, která vede k maligní přeměně lézí, a zároveň se vyskytuje až v 95% všech případů PDAC (Almoguera et al., 1988; Jones et al., 2008). Způsobuje konstitutivní aktivaci K-Ras, malé GTPázy, jež štěpením GTP ovlivňuje postup signalizace v buňce (Obr. 3). Změna v polypeptidovém řetězci K-Ras brání interakci s GTP aktivačním proteinem, který stimuluje hydrolytickou aktivitu tohoto signalizačního proteinu, a ponechává ho tedy ve své aktivní formě, s navázaným GTP. Výsledkem pak je aktivace ERK a PI3K kaskád a následná stimulace buněčného růstu a anti-apoptotických signálů nebo například navození dráhy jaderného faktoru NF-κB, která ovlivňuje epiteliálně-mezenchymální přeměnu (EMT) a citlivost nádorových buněk k terapeutické léčbě (Eser et al., 2014). Tyto dráhy jsou dále podporovány vazbou epidermálních růstových faktorů (EGF) na příslušné receptory, jejichž hladina je v pankreatických rakovinných buňkách výrazně zvýšena (Oliveira-Cunha et al., 2011). Narušená K-Ras signalizace je navíc pravděpodobně nezbytná nejen k iniciaci, ale také k rozvoji rakoviny pankreatu, jelikož zasahuje i enzymy metabolismu glukózy a glutaminu, na kterých jsou pankreatické nádorové buňky silně závislé (Eser et al., 2014; Son et al., 2013).



Obr. 3: Zjednodušené schéma K-Ras signalizace v rakovině pankreatu. K-Ras (lidský homolog virového onkogenu K-Ras, z angl. *Kirsten rat sarcoma*), GAP (GTPázu aktivující protein), GEF (guanidinový výměnný faktor), PI3K (phosphatidylinositol-3-kináza), ERK (kinázy regulované extracelulárními signály), ECM (extracelulární matrix).

Tumor supresorové proteiny p16 (*CDKN2A*, inhibitor cyklin dependentní kinázy 2A) a p53 (*TP53*, tumor supresor p53) jsou stěžejními regulátory buněčného cyklu, buněčné smrti a odpovědi na poškození DNA. Ztrátou jejich funkce tak může dojít k nekontrolovatelnému dělení buněk potřebnému pro nádorovou transformaci pankreatických lézí (Schutte et al., 1997). Podobně funguje i v PDAC méně častá mutace jiného tumor supresoru SMAD4 ovlivňujícího genovou expresi ve spolupráci s transformujícím růstovým faktorem TGFβ (Bardeesy et al., 2006).

Do průběhu PDAC zasahují i další dráhy využívané nádorovými buňkami ke změnám v metabolismu a karcinogenezi, například hypoxií indukovaný faktor HIF-1, nebo dráhy Shh a Wnt/Notch, které určují, jakou diferenciací kapacitou budou buňky disponovat (Jones et al., 2008; Zhong et al., 1999). Na významný vliv další signální kaskády, a to serin threoninové kinázy LKB1 (jaterní kináza B1) a navazující AMP aktivované protein kinázy (AMPK), poukazuje výrazný nárůst výskytu PDAC současně s Peutz-Jeghersovým syndromem, který pramení z dědičné mutace právě genu pro LKB1 (Van Lier et al., 2010).

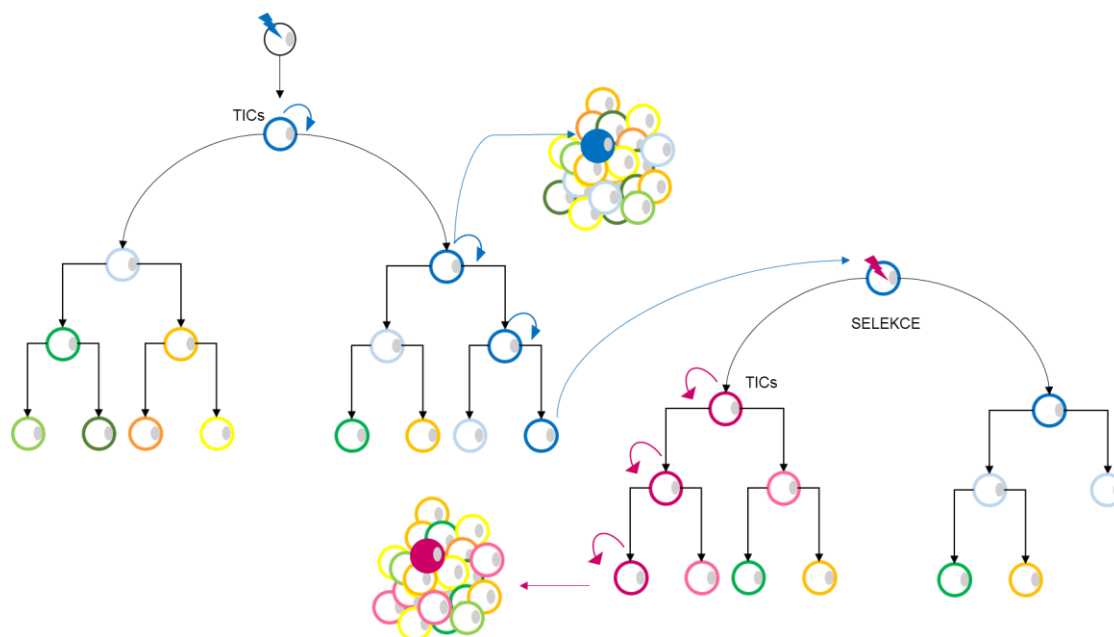
Pro rakovinu slinivky břišní je příznačné oproti mnohým jiným zhoubným nádorům rozsáhlé nádorové stroma, podpurná tkáň nádorových buněk tvořená buňkami imunitního systému, aktivovanými fibroblasty, tzv. stelárními buňkami, endoteliálními buňkami a růstovými faktory, jež tyto buňky produkují, cytokiny nebo proteiny extracelulární matrix (ECM), například kolagenem a integriny. Takto bohaté mikroprostředí ovšem zhoršuje cévní zásobení nádoru z důvodu vytvoření silné prostorové bariéry, která zároveň může zabraňovat i vstřebávání chemoterapeutik. Pankreatické rakovinné buňky se tak v každém případě musí vyrovnat s metabolickým a oxidativním stresem, což činí výše popsáním hromaděním mutací onkogenů a tumor supresorových genů a s tím spojenou metabolickou adaptací, v níž hlavní roli hraje kromě aerobní glykolýzy také závislost na metabolismu glutaminu a lipidů (Son et al., 2013). Pro přežití buněk nádoru pankreatu se dále ukázala jako nezbytná například glykosylační modifikace regulující stabilitu proteinů a transkripčních faktorů prostřednictvím hexosaminové biosyntetické dráhy (Guillaumond et al., 2013). Nehostinné hypoxické prostředí se tak vlivem selekčního tlaku podaří přežít jen těm nejodolnějším a nejagresivnějším buňkám, které se na výše uvedené procesy nejlépe přizpůsobí, a díky tomu dosáhnou i většího potenciálu pronikat do dalších tkání a tvořit sekundární nádorová ložiska (Yachida et al., 2010). Tento model tzv. klonální selekce přisuzuje všem nádorovým buňkám, každému klonu, možnost podněcovat tvorbu maligního novotvaru. Nedokáže však dostatečně vyložit neúspěch

terapeutické léčby, která je u rakoviny pankreatu obzvláště patrná, neboť často dochází k relapsu tohoto nádorového onemocnění (Lonardo et al., 2013).

Před časem byla identifikována malá populace buněk u akutní myeloidní leukémie, jež vykazovala vlastnosti podobné normálním kmenovým buňkám, a to schopnost asymetrického dělení a sebeobnovy (Bonnet a Dick, 1997). Později byly takové buňky rozpoznány i u dalších zhoubných nádorů, včetně rakoviny slinivky břišní (Li et al., 2007). Oproti klonální teorii, ke které se nyní přiklání již poměrně málo zastánců, tak mají tyto buňky schopnost iniciovat tvorbu nádoru, která je studována na základě experimentů s imunodeficientními myši, zejména s ohledem na menšinové buněčné populace (Bonnet a Dick, 1997). Dnes tyto subpopulace označujeme jako nádor iniciující buňky (TICs), nebo též rakovinné kmenové buňky, které se od ostatních nádorových buněk kromě zmiňované kmenovosti liší přítomností specifických povrchových markerů a rozdílnou aktivitou mnohých signalizačních drah, regulačních miRNA či hladinou proteinů regulujících kupříkladu buněčnou smrt (Reya et al., 2001). Díky tomu TICs snáze infiltrují do okolních tkání a tvoří metastáze; a mají také zvýšenou aktivitu DNA reparačního systému - proto snáší větší množství poškození DNA. TICs se navíc vyskytují převážně v G0 fázi buněčného cyklu, a tudíž na mnohá chemoterapeutika zaměřená spíše na proliferující buňky nereagují (Lamb et al., 2014; Reya et al., 2001). Výše popsané znaky tedy tímto způsobem napomáhají TICs přežít a překonat klasické způsoby léčby, což se projevuje recidivou nádorového onemocnění.

Původ TICs je ovšem dosud nejasný. Pravděpodobně by mohly vznikat mutacemi genů normálních kmenových buněk a následně se diferencovat do různých buněčných nádorových typů, ale mohou se patrně vyvinout i z již diferencovaných buněk řízenou změnou svého expresního genového profilu (Penchev et al., 2012). Není vyloučena ani jistá propojenost obou modelů rozvoje rakoviny (Obr. 4, s. 17), neboť byla prokázána existence subpopulací kmenových nádorových buněk, které se mohly vyvinout selekcí z TICs (Hermann et al., 2007). Při vývoji nových léčebných postupů je tak nutné cílit nejen na dělící se a více diferencované buňky, ale i na další populace buněk, zejména pak TICs, přičemž potenciální strategií by mohlo být využití právě jejich povrchových markerů. Přestože však již bylo i v případě rakoviny slinivky břišní rozpoznáno poměrně velké množství těchto proteinů, mezi nimi například CD44,

CD24, CD133, CXCR4, c-MET nebo ALDH1, nejsou dodnes stanoveny žádné markery, které by jasně tyto buňky definovaly (Ansari et al., 2011; Hermann et al., 2007; Li et al., 2007).



Obr. 4: Rozvoj rakoviny dle modelu nádor iniciujících buněk (TICs) se schopností asymetrického dělení i sebeobnovy a selekční teorie. Selektční tlak nádorového mikroprostředí a schopnost nádor iniciujících buněk se odlišodlišně adaptovat vede k přežívání těch nejagresivnějších buněk, které snáze vytváří maligní novotvary.

2.1.3 Léčebné strategie

Jediným efektivním způsobem léčby rakoviny pankreatu je v současné době operativní zákrok většinou doplňovaný před- i pooperativní chemo-radioterapií. Pouze asi 20% pacientů je však diagnostikováno včas s primárními nádory případně lokálními lézemi, a jsou tedy k operaci způsobilí. Ani úspěšná resekce však neposkytuje nikterak optimistickou prognózu a šance pacientů na přežití více než 5 let jsou velmi nízké (Saif, 2007). V případě odhalení pokročilých stadií PDAC jsou pak předpovědi ještě méně příznivé a vývoj nových terapeutických přístupů je tak nezbytný.

Nejčastěji jsou dnes pro paliativní léčbu rakoviny slinivky břišní vedoucí k prodloužení života a zlepšení jeho kvality využívána chemoterapeutika, v první řadě gemcitabin, který nahradil dříve zavedený 5-fluorouracil, a to díky lepší klinické odpovědi pacientů (Burris a Storniolo, 1997). Účinek gemcitabinu je u pacientů s dobrým celkovým stavem dnes obvykle podporován ozařováním případně dalšími látkami, například fluoropyrimidiny či analogy cis-platiny (Heinemann et al., 2008). Přesto pozitivní vliv na průběh onemocnění při aplikaci různých kombinací těchto chemoterapeutik v porovnání s gemcitabinem samotným je jen velice mírný, popřípadě nebyl pozorován (Heinemann et al., 2008). Dosud nejvýraznější úspěch zaznamenal

Folfirinox, kombinace cytostatik leukovorinu (derivát vitamínu B), 5-fluorouracilu (analog pyrimidinu), irrinotekanu (inhibitor topoizomerázy) a oxaliplatiny (inhibitor oprav DNA), který průměrně prodlužuje život pacientů až o jeden rok. Tento přípravek je ovšem nesmírně toxický s řadou vedlejších účinků, a tak je doporučován pouze pacientům v dobrém zdravotním stavu (Conroy et al., 2011). Kromě těchto hlavních zavedených léčebných strategií jsou neustále vyvíjeny nové přístupy zaměřené přímo na rakovinné buňky a jejich metabolismus nebo nádorové stroma. Ve fázi klinických testů jsou například inhibitory receptorů epidermálních růstových faktorů, tyrosin kináz, endoteliálních růstových faktorů nebo inhibitory glutaminového metabolismu a monokarboxylátových přenašečů, kterými je zprostředkován transport laktátu (Kourie et al., 2016).

Průlom v léčbě rakoviny slinivky břišní by mohl nastat cílením malých molekul do mitochondrií, neboť dvě výzkumné skupiny nezávisle na sobě odhalily výsadní závislost pankreatických rakovinných kmenových buněk na oxidativní fosforylaci (Sancho et al., 2015; Viale et al., 2014). Dílčí úspěchy této strategie již prokazuje metformin, inhibitor mitochondriálního komplexu I, jenž je diskutován kapitole 2.6. Třebaže účinky metforminu jsou stále značně sporné, za předpokladu klíčové role rakovinných kmenových buněk pro vznik maligního nádoru pankreatu se v každém případě jeví mitochondrie jako velice nadějný cíl.

2.2 Mitochondrie a mitochondriální funkce

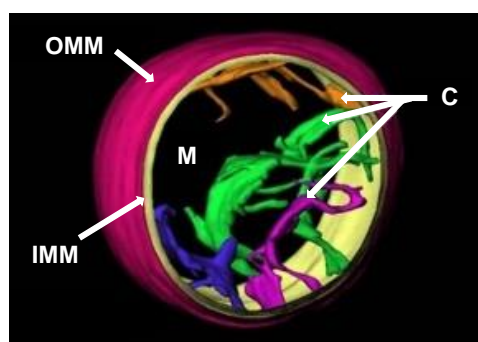
Mitochondrie byly prvně pozorovány Richardem Altmannem v roce 1890, který je charakterizoval jako jednoduché organismy žijící uvnitř buňky. O několik let později se začaly objevovat první důkazy endosymbiotického původu mitochondrií na základě morfologických podobností s bakteriemi (Ernster a Schatz, 1981). Všeobecně přijímána však byla tato hypotéza až ve druhé polovině 20. století, kdy bylo možné zkoumat pomocí pokročilejších zobrazovacích technik a analýz například přítomnost vlastní mitochondriální DNA (mtDNA) blízké DNA bakterií rodu *Rickettsia* nebo výskyt kardiolipinu či porinů jak v membráně mitochondrií tak i těchto bakterií (Andersson, 1998; Mileykovskaya, 2009; Zeth, 2010).

V současné době známe mitochondrie jako semiautonomní organely s dvojitou membránou tvořící dynamické retikulum, jež v eukaryotní buňce reguluje ty nejzásadnější buněčné procesy. Mitochondriální enzymy se účastní redoxních reakcí koenzymů NADH a FADH₂, během nichž dochází postupně k přenosu elektronů na komplexy elektronového transportního řetězce (ETC), vytvoření elektro-chemického gradientu a tvorbě ATP oxidativní fosforylací (OXPHOS) (Nunnari a Suomalainen, 2012). Pro další mitochondriální funkce, jako například regulace hladiny vápenatých iontů a s ní spojené signalizace nebo transport proteinů, je velmi důležité udržování membránového potenciálu, což zajišťuje také již zmiňovaný systém OXPHOS (Miller, 1998; Neupert a Herrmann, 2007). Mitochondrie se dále podílí na řízení programové buněčné smrti (apoptózy), na metabolismu mastných kyselin, steroidů, aminokyselin a pyrimidinů a jsou místem syntézy Fe-S klastrů a hemu (Beinert, 1997; Liu, 1996; Nunnari a Suomalainen, 2012). Vznikají zde také reaktivní formy kyslíku (ROS), signální molekuly ovlivňující buněčný cyklus, diferenciaci nebo odpověď na stresové podněty (Hamanaka, 2010). V posledních letech také narůstají nové poznatky o úloze mitochondriální dynamiky zahrnující morfologickou přestavbu, fúzi a štěpení mitochondrií v adaptaci na energetické potřeby buňky (Bereiter-Hahn a Voth, 1994; Schrepfer a Scorrano, 2016).

2.3 Stavba mitochondrií

Mitochondrie jsou obklopeny dvěma fosfolipidovými membránami, vnější (OMM) a vnitřní (IMM), mezi nimiž se nachází mezimembránový prostor (IMS) (Obr. 5, s. 20). Zatímco vnitřní membrána není propustná ani pro většinu iontů a malých molekul pro zachování elektrochemického gradientu, OMM obsahuje proteiny vytvářející β -barelové útvary propustné pro malé hydrofilní molekuly, tzv. poriny, nebo též napětově ovládané kanály selektivní pro

anionty (VDAC) (Colombini, 1980). Mimo to disponuje OMM přenašečovými proteiny či apoptózu řídícími proteiny rodiny Bcl-2 (Liu, 1996; Neupert a Herrmann, 2007). S IMM jsou asociovány transportní proteiny, karnitinové transferázy, iontové přenašeče, translokázy adeninových nukleotidů nebo enzymy ETC, pyrimidinového metabolismu či syntézy hemu (Szabo a Zoratti, 2014). Pro navýšení enzymatické kapacity mitochondrií je zvětšena plocha IMM do četných výběžků, neboli krist, zanořených do matrix, vnitřního mitochondriálního prostoru, kde se kromě vlastní mitochondriální DNA nachází také enzymy oxidativního metabolismu pyruvátu, mastných kyselin a citrátového cyklu (Lever, 1958; Mannella, 2006).

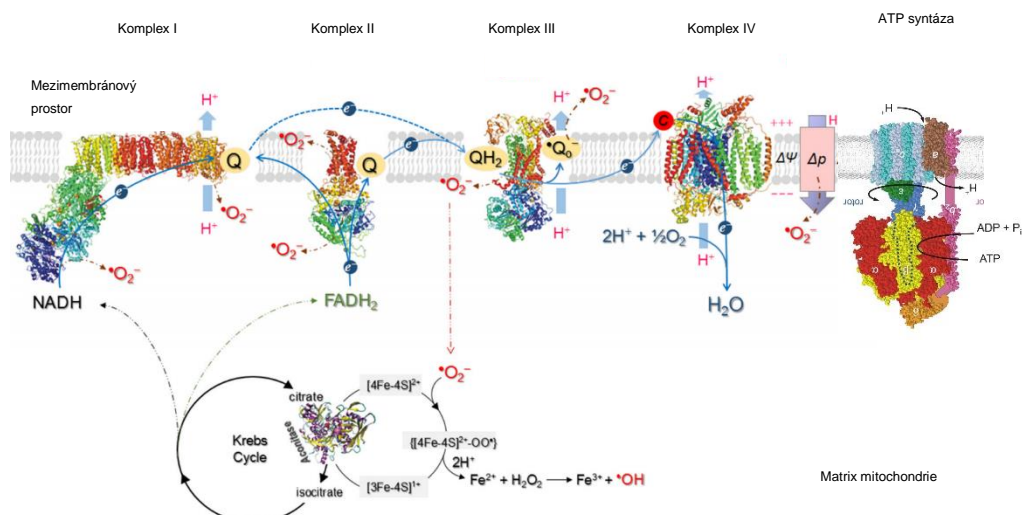


Obr. 5: Stavba mitochondrie. Model vytvořený na základě kryo-elektronové tomografie zobrazující vnější (OMM) a vnitřní (IMM) mitochondriální membránu, matrix mitochondrií (M) a kristy (C). Převzato z (Manella, 2006).

2.4 Komplexy oxidativní fosforylace

2.4.1 Elektronový transportní řetězec

ETC, nebo také dýchací řetězec, je systém spolupracujících enzymů (komplexů I – IV) a elektronových přenašečů (ubichinonu, též koenzym Q, CoQ, a cytochromu c) na vnitřní mitochondriální membráně (Obr. 6, s. 21). Energie uložená v živinách je oxidativně metabolizována v citrátovém cyklu a v podobě elektronů je dále převedena na kofaktory NAD^+ a FAD, jež se tímto přenosem redukují. Reoxidačními reakcemi obou kofaktorů zprostředkovanými právě ETC je kyslík redukován na vodu za současné translokace protonů z matrix mitochondrií do IMS, která je umožněna díky zvyšujícímu se redoxnímu potenciálu jednotlivých mitochondriálních komplexů, jež si elektrony předávají. Zatímco reoxidace NADH součinností komplexů I, III a IV umožňuje translokaci 10 protonů, komplex II a další enzymy redukující koenzym Q, například glycerol-3-fosfát-dehydrogenáza nebo dihydroorotát reduktáza, k tomu nepřevezmou dostatečné množství energie (Sazanov, 2015).



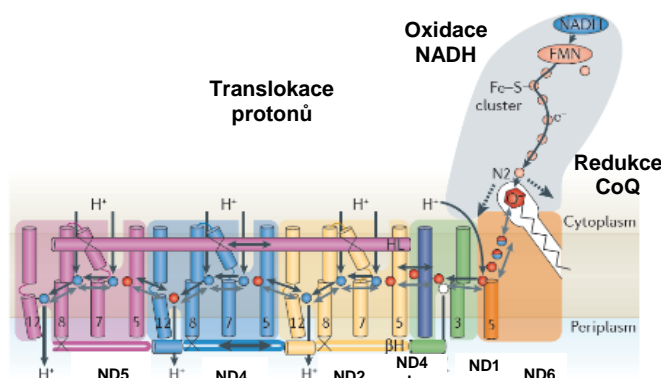
Obr. 6: Komplexy oxidativní fosforylace. Komplexy ETC: I, III a IV využívají energii z redoxních reakcí k translokaci protonů, čímž vytváří protonový gradient, který zužitkovává komplex V, F_1F_0 -ATP syntáza. Transport elektronů mezi komplexy umožňují přenašeče koenzym Q (Q) a cytochrom c (C). Elektrony z NADH, který je redukován v citrátovém cyklu, redukují pomocí komplexu I koenzym Q. QH_2 je reoxidován komplexem III za současné redukce cytochromu c. Cytochrom c je využíván komplexem IV k redukci molekulární O_2 . Komplex II je dalším možným místem vstupu elektronů do ETC. Na každou molekulu $NADH_2$ je translokováno 10 protonů a pro syntézu 1 molekuly ATP je spotřebováno 2,7 protonů. Struktury jednotlivých komplexů jsou odvozeny z *T. thermophilus* (komplex I), *S. scrofa* (komplex II) a *B. taurus* (komplexy III-V). Δp znázorňuje elektrický potenciál. Upraveno dle (Chen a Zweiter, 2014).

Společně vytvořený elektrochemický gradient nakonec pohání fosforylaci ADP na ATP prostřednictvím komplexu V (F_0F_1 ATP syntázou). Spřažení mitochondriální respirace, spotřeby kyslíku, s oxidativní fosforylací tak zajišťuje tvorbu většiny ATP, které eukaryotní buňky využívají (Mitchell, 2011).

2.4.2 Komplex I (NADH:ubichinon oxidoreduktáza)

Komplex I (Obr. 7, s. 22) je největším enzymem (~1 MDa) respiračního řetězce. Jeho 14 hlavních a evolučně konzervovaných podjednotek lze u většiny eukaryot strukturně rozdělit na 7 hydrofilních polypeptidů kódovaných v jádře a 7 polypeptidů hydrofobních, jejichž DNA je uložena v genomu mitochondrií (Baradaran et al., 2013; Vinothkumar et al., 2014). Obě skupiny peptidů vytváří nezávisle na sobě fungující raménka molekuly komplexu I, která tak ještě spolu s dalšími jednotkami připomíná tvar písmene L (Sazanov, 2015). Periferní doména, jež zajišťuje oxidaci a dehydrogenaci NADH, obsahuje nekovalentně vázaný flavin mononukleotid (FMN), primární akceptor elektronů. FMN je propojený s vazebným místem CoQ pomocí 7 [Fe-S] redoxních center (Vinothkumar et al., 2014). Membránová doména zahrnuje podjednotky ND1 - ND6 a ND4L, z nichž 4 mají charakter bakteriálního antiporteru

a slouží k translokaci protonů (Moparthi, 2014; Vinothkumar et al., 2014). Mezi sebou jsou domény propojeny takzvaným Q modulem redukujícím koenzym Q (Vinothkumar et al., 2014).



Obr. 7: Schéma translokace protonů spojená s redoxními reakcemi komplexu I. Elektrony z NADH jsou odtrženy pomocí FMN a transportovány Fe-S až na CoQ, který je tímto redukován. CoQH₂ vyvolává konformační změny ND1 a ND6, kterými dochází k dalším konformačním změnám helixu HL a dalších ND podjednotek, čímž dochází k předání energie využívané k translokaci protonů. Upraveno dle (Sazanov et al., 2015).

2.4.3 Komplex II (sukcinát:ubichinon oxidoreduktáza)

Komplex II, nejmenší z komplexů dýchacího řetězce (~140 kDa), propojuje citrátový cyklus a respirační řetězec dvěma odlišnými reverzibilními redoxními reakcemi, přeměnou mezi sukcinátem a fumarátem katalyzovanou solubilní doménou komplexu II, a přeměnou mezi CoQ a CoQH₂ (redukováný CoQ) zprostředkovanou membránovou částí (Iverson, 2013). Solubilní doména je větším heterodimerem podjednotek A a B. Katalytické místo A podjednotky se soustředí kolem tzv. Rossmanova proteinového motivu, kam se kovalentně váže kofaktor FAD, který zprostředkovává oxidaci sukcinátu na fumarát. Elektrony z FADH₂, které následně přejímají 3 [Fe-S] redoxní centra, slouží poté pro redukci CoQ na komplexu hem-cytochrom b vazebných proteinů (Iverson, 2013; Sun et al., 2005).

2.4.4 Komplex III (koenzym Q:cytochrom c oxidoreduktáza)

Každý ze dvou monomerů komplexu III (~500 kDa) se skládá z 11 podjednotek, z nichž však pouze 3 nesou následující redoxní centra: cytochrom b, jehož DNA je jako jediná uložena v mitochondriálním genomu, cytochrom c₁ a [Fe-S] Rieskeho centrum (Iwata et al., 1998). Ostatní podjednotky plní zřejmě strukturní funkci nebo mají úlohu v mitochondriálním transportu (Braun, 1995; Iwata et al., 1998). Komplex III přispívá k tvorbě protonového gradientu díky spřažení reoxidační reakce redukováného CoQH₂ v tzv. Q-cyklu s aktivním transportem protonů do mezimembránového prostoru mitochondrií. Q-cyklus efektivně řeší přítomnost pouze jedné hemové skupiny cytochromu c, přestože CoQ je přenašečem dvou elektronů. První elektron CoQH₂ je transportován přes Rieskeho centrum na cytochrom c₁, kde

jej přebírá solubilní cytochrom c. Druhý elektron je převzat hemovými centry, což umožňuje jejich zvyšující se redoxní potenciál, až na další molekulu CoQ, který se tak částečně redukuje. K redukci CoQ tedy dochází až přenosem dvou elektronů uvolněných při oxidačních reakcích dvou CoQH₂. Další dva elektrony z těchto reakcí váží molekuly cytochromu c, což umožňuje translokaci 4 protonů do IMM (Mulikidjanian, 2005).

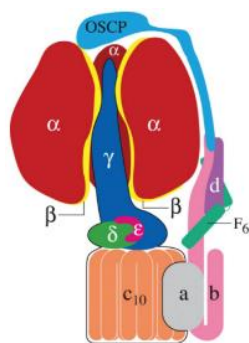
2.4.5 Komplex IV (cytochrom c oxidáza)

Poslední enzym ETC, cytochrom c oxidáza (COX), lokalizovaný na IMM, katalyzuje závěrečný krok série redoxních reakcí, redukci molekulárního kyslíku na vodu. I zde je uvolněná energie využita k translokaci protonů do IMS. COX je homodimer složený ze 13 párů polypeptidových řetězců, z nichž tři jako jediné mitochondriálně kódované (COXI, COXII, COXIII) tvoří katalytické jádro celého komplexu (Shinzawa-Itoh, 2007; Tsukihara, 1996). Podjednotka COXII je tvořena membránovou doménou a velkou hydrofilní globulární doménou, která poskytuje vazebné místo pro redukovaný cytochrom c, jehož elektron zde přebírá měďnaté centrum Cu_A. K redukci O₂ dochází v místě největší a evolučně konzervované podjednotky, COXI, v tzv. binukleárním centru s prostetickými skupinami hem a₃ a Cu_B, které přejímají elektrony z dalšího redoxního centra této podjednotky, cytochromu a. Třetí podjednotka pravděpodobně slouží k transportu O₂ do výše uvedeného aktivního centra COXI komplexu IV (Shinzawa-Itoh, 2007). COX tedy zprostředkovává přenos 4 elektronů ze 4 molekul redukovaného cytochromu c na O₂ za vzniku dvou molekul H₂O a translokace 4 protonů, z nichž dva jsou nicméně spotřebovány při této redukční reakci.

2.4.6 Komplex V (F₁F₀-ATP syntáza)

Energie transmembránového elektrochemického gradientu (Δp) vytvořeného během buněčné respirace je využívána F₁F₀-ATP syntázou (zkráceně ATP syntáza) k fosforylaci ADP v matrix mitochondrií. ATP syntáza (Obr. 8, s. 24) je multiproteinový komplex (~600 kDa) vázaný na IMM prostřednictvím své F₀ podjednotky, která je propojena s katalytickou částí syntetizující ATP, F₁ podjednotkou, množstvím proteinů tvořících centrální a periferní stopku (Baker, 2012; Walker, 2013). F₀ část ATP syntázy se kromě uvedené periferní stopky skládá z c-prstence, A6 podjednotky a několika dalších polypeptidů. A6 podjednotka pravděpodobně umožňuje průnik protonům proudících díky Δp přes c-prstenec, který je tak roztáčen společně s navazující

centrální stopkou F_1 podjednotky (Baker, 2012; Walker, 2013; Walker, 1990). Tento dosud všeobecně uznávaný tzv. rotační mechanismus pak vyvolává změny konformací β F_1 podjednotek a syntézu ATP (Boyer, 1989; Noji, 1997). K otočení katalytického jádra F_1 podjednotky o 360° je třeba převést 8 protonů do matrix mitochondrií a vznikají tak tímto způsobem tři molekuly ATP (Walker, 2013).



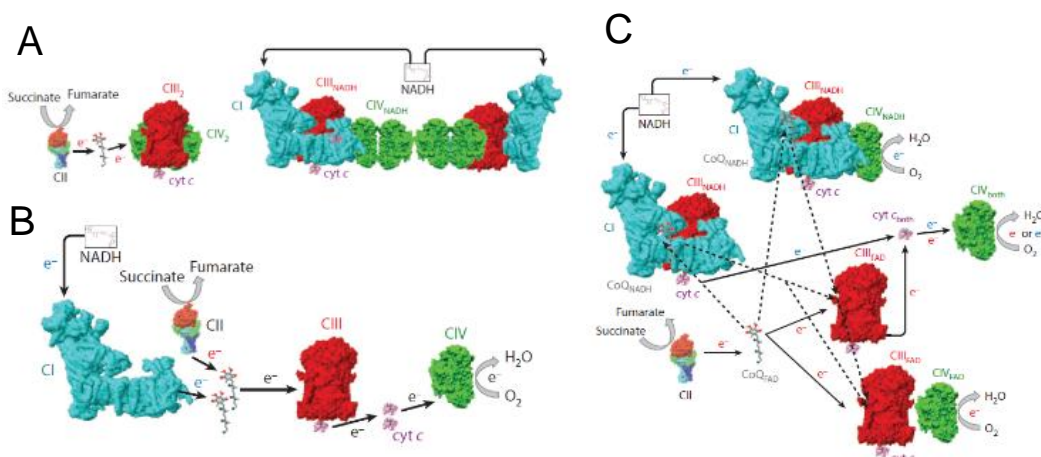
Obr. 8: Schématické znázornění F1F0 ATP syntázy. Jedna z β podjednotek není pro zobrazení centrální stopky viditelná. Proteiny rotoru ATP syntázy mají černý obrys. Další membránové podjednotky e, f, g, A6L a inhibitor IF1 nejsou vyznačeny. Převzato z (Gledhill a Walker, 2006).

F_1F_0 ATP syntáza může za poklesu $\Delta\Psi$ rovněž obrátit směr rotace svého motoru, ATP hydrolyzovat a protony transportovat do IMS. Reakce je inhibována proteinem IF_1 , který ATP syntázu spolu s dalšími faktory stabilizuje ve formě di- až oligomerů, jež vytváří ohyby krist IMM a zřejmě tak zvyšují i efektivitu oxidativní fosforylace (Strauss, 2008; Walker, 2013).

2.4.7 Mitochondriální superkomplexy

Původní strukturní modely mitochondriálních komplexů vysvětlující mechanismus buněčné respirace byly během posledních let nahrazeny novým, tzv. modelem plasticity. Prvně navržený model přítomnosti enzymů respiračního řetězce v komplexu jako jedné stabilní jednotky respirace byl později nahrazen fluidním modelem, který popisoval přenos elektronů pomocí přenašečů CoQ a cytochromu c difuzí a náhodnými chemickými srážkami mezi samostatně existujícími respiračními komplexy (Acin-Perez, 2014; Chance, 1955). Metodou nativní elektroforézy se však podařilo izolovat jak samostatné enzymy, tak jejich shluky do tzv. superkomplexů a ani jeden z původních modelů nebyl schopen tuto skutečnost vysvětlit (Acin-Perez, 2014; Shagger, 2000).

Model plasticity tedy předpokládá, že mitochondrie se na měnící metabolické podmínky a prostředí adaptují vlastní reorganizací pro zachování co nejvýhodnějšího výkonu, a to právě včetně změn v uspořádání komplexů dýchacího řetězce, přičemž předchozí modely zřejmě fungují jako krajní meze (Obr. 9, s. 25) (Bianchi et al., 2004; Cogliati et al., 2016).

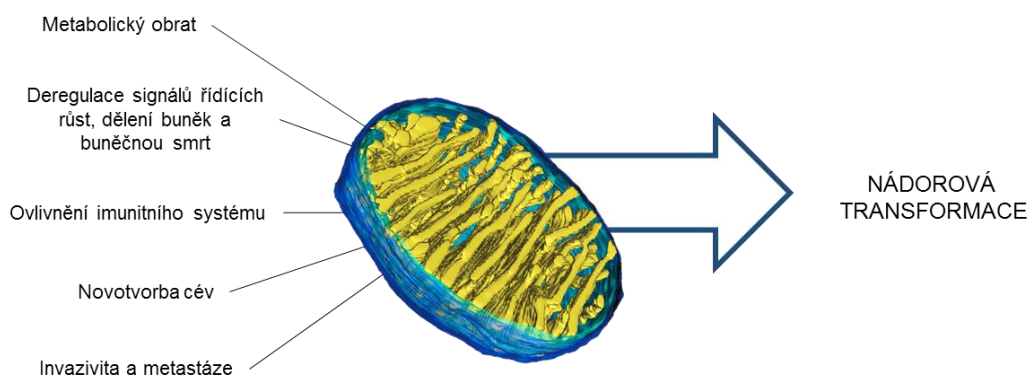


Obr. 9: Modely transportu elektronů mezi komplexy respiračního řetězce. (A) Stabílní model tzv. oxysomu. (B) Fluidní model. (C) Model Plasticity. Vyznačeny jsou jednotlivé komplexy dýchacího řetězce CI-IV (komplexy I-IV) mezi kterými jsou elektrony transportovány (vyznačeno šipkami) přenašeči cytochromem c (cyt c) a koenzymem Q (CoQ). Číselné indexy označují počet kopií daného komplexu. Převzato z (Enríquez, 2015).

Kromě superkomplexu $I_1/III_2/IV_1$, též nazývaného respirasom, který se u savců pravděpodobně vyskytuje nejčastěji, byla také prokázána asociace komplexů I a III a dále komplexu III spolu s komplexem IV. Komplex II zřejmě pro své postavení v citrátovém cyklu superkomplexy netvoří, anebo jen ve velmi malé míře (Enríquez, 2016). Přesná stavba a důvod interakce jednotlivých komplexů jsou stále předmětem výzkumu. Přesto je již nyní prokázáno, že počet superkomplexů se odvíjí od dostupnosti různých substrátů dýchacího řetězce. Například při hladovění, kdy je využíván především metabolismus mastných kyselin, je upřednostňován spíše rozpad superkomplexů (Genova a Lenaz, 2014). K dispozici jsou dále studie evidující pozitivní úlohu superkomplexů v regulaci hladiny ROS nebo závislost jejich množství na členění IMM do krist či závislost stability komplexu I na seskupení v superkomplexu (Acin-Perez, 2014; Cogliati et al., 2013; Genova a Lenaz, 2014).

2.5 Úloha mitochondrií v rakovině

Souvislost mezi rakovinou a mitochondriemi poprvé představil Otto Warburg, který pozoroval, že rakovinné buňky upřednostňují pro tvorbu energie glykolytický metabolismus následovaný produkcí laktátu, a to i v případě dostatečného množství kyslíku, zatímco nemaligní buňky v takových podmínkách využívají mitochondriální OXPHOS. Warburg považoval za příčinu tohoto jevu, aerobní glykolýzy, poškození mitochondrií způsobující i nádorovou transformaci (Vander Heiden et al., 2009; Warburg, 1956). Tato domněnka ovšem platí spíše za výjimečných okolností, v případě samotných mutací v mtDNA, například v genech pro sukcinát dehydrogenázu nebo fumarát hydratázu (Baysal, 2000; Tomlinson et al., 2002). Ve většině případů se naopak předpokládá nepostradatelnost funkčních mitochondrií z důvodu jejich schopnosti řídit metabolický obrat, ovlivnit proliferaci potenciál a schopnost přežívání buněk, působit na imunitní systém, napomáhat novotvorbě cév, pronikat do okolních tkání a tvořit metastázy, jak je znázorněno na Obr. 10 (Galluzzi et al., 2010). Současná hypotéza je již podpořena četnými důkazy, například zkoumáním vlivu inaktivace laktát dehydrogenázy (LDH) A pomocí RNA interference na metabolismus rakovinných buněk nebo pozorováním horizontálního přenosu mtDNA za účelem obnovení mitochondriální funkce (Fantin et al., 2006; Tan et al., 2015).



Obr. 10: Schématické zobrazení mitochondriální úlohy v řízení některých buněčných procesů vedoucích k nádorové transformaci.

2.5.1 Energetický metabolismus rakovinných buněk

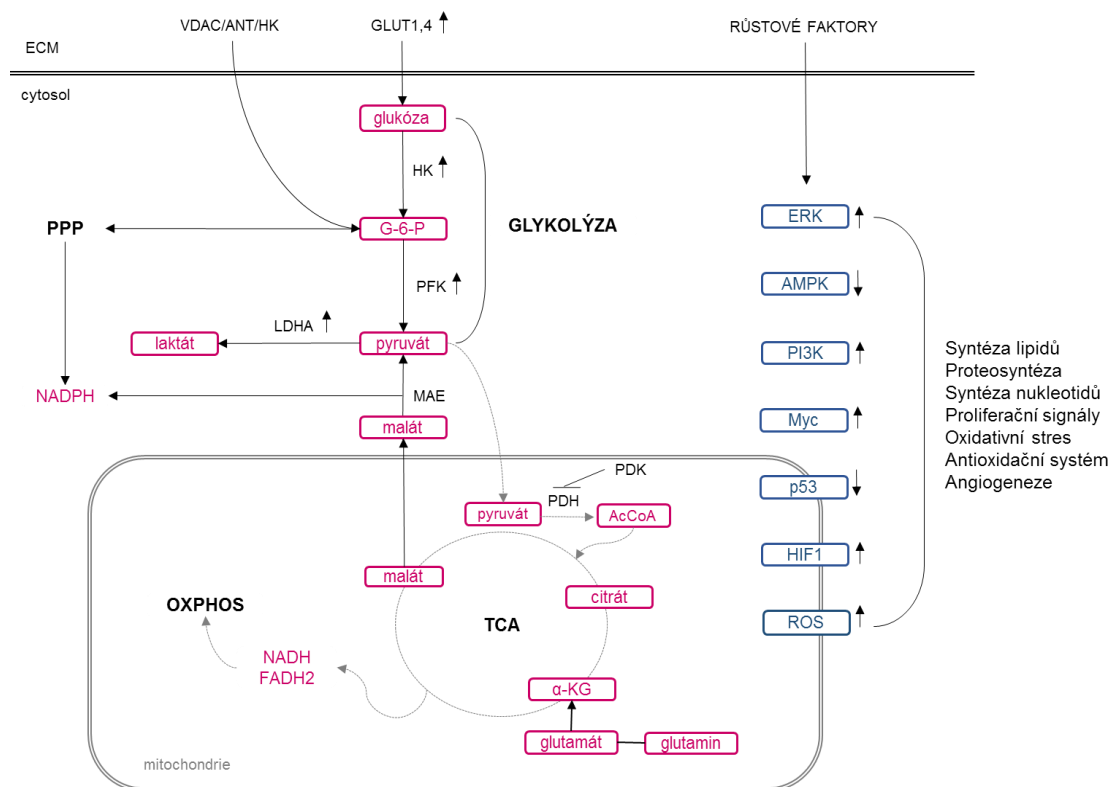
Dělící se buňky za normálních podmínek přijímají signály v podobě růstových faktorů prostřednictvím svých povrchových receptorů, které je k cílovým efektorům převádí několika fosforylačními kaskádami ovlivňujícími přežívání, migraci, růst i přímo dělení buněk. Podobně jako běžně proliferující buňky, i rakovinné buňky si pro pokrytí náročných energetických

požadavků nepochybně potřebují zajistit rychlou tvorbu ATP a makromolekul i udržování redoxní rovnováhy (Vander Heiden et al., 2009). K dosažení těchto nároků dochází mutacemi protoonkogenů a tumor supresorových genů, jejichž produkty řídí či regulují rozličné signalizační dráhy, z nichž alespoň některé působí v mitochondriích.

Mezi události, které se v procesu nádorové transformace vyskytují nejčastěji, lze zařadit změny v signalizačních kaskádách ERK, PI3K či AMPK a drah transkripčních faktorů p53 nebo Myc (Galluzzi et al., 2010; Kroemer a Pouyssegur, 2008). Za přispění rozrůstajícího se nádorového mikroprostředí navíc dochází k aktivaci faktoru HIF-1 v odpovědi na oxidativní stres, jemuž jsou nádorové buňky takřka typicky vystavovány. Dohromady tedy lze tyto výše jmenované faktory označit za stěžejní účastníky metabolického obratu rakovinných buněk, jejichž společným rysem je snaha zajistit dostatečný přísun energie buňce k anabolickým procesům, a to zejména využitím aerobní glykolýzy ale i dalších reakčních cyklů.

Ke stimulaci aerobní glykolýzy dochází zejména pomocí již výše uvedených PI3K, HIF-1 a Myc proteinů zesilujících expresi glukózových přenašečů, které primární substrát této reakce, glukózu, transportují do buňky. Tyto proteiny navíc například dohromady s p53 zvyšují aktivitu enzymů, jež řídí limitující kroky glykolýzy, hexokinázu (HK), fosfofruktokinázu či LDH. Současně dochází k potlačení OXPHOS v důsledku inhibice ATP syntázy prudkým poklesem hladiny ADP, které je spotřebováváno při substrátové fosforylaci v glykolýze (Wallace, 2005). OXPHOS je dále tlumen asociací mitochondriální HK s kanálem VDAC a ATP/ADP přenašečem (ANT), pravděpodobně vlivem konstitutivní aktivace PI3K-LKB1 dráhy. Tato interakce vede k transportu mitochondriálního ATP přímo k HK, která zároveň váže do svého aktivního místa glukózu, jež je tímto fosforylována, uvolněna v cytosolu a dále využívána v glykolýze (Mathupala et al., 2006). K tomuto procesu může docházet též vlivem HIF-1 aktivujícím kinázu pyruvát dehydrogenázy, jež zamezuje vstupu pyruvátu do citrátového cyklu či signalizací p53 (Kim et al., 2006; Matoba, 2006). K metabolickému obratu (Obr. 11, s. 28) dále přispívá mTOR (cílová molekula působení rapamycinu u savců) signalizace aktivovaná za účelem biosyntézy proteinů a lipidů, translace mRNA a biogeneze ribosomů (Kroemer a Pouyssegur, 2008). Přitom mTOR působí i jako významný aktivátor HIF-1, čímž je pozitivní zpětnou vazbou znásoben signál k tvorbě ATP prostřednictvím glykolýzy (Guertin a Sabatini, 2007). Naopak proti mTOR reaguje AMPK, často oslabená v nádorové signalizaci pro prevenci řádné odpovědi na stresové podněty (Shackelford a Shaw, 2009).

Nádorové buňky zpracovávají glukózu i dalším reakčním mechanismem, v pentózo-fosfátovém cyklu, který slouží k tvorbě pětiuhlíkatých cukrů, prekurzorů syntézy nukleotidů, a kofaktorů NADPH účastnících se biosyntézy makromolekul a reoxidačních reakcí antioxidantů glutathionu a tioredoxinu. Dostatečný přísun NADPH je dále zabezpečován metabolismem glutaminu, jenž svoji přeměnou na glutamát a α -ketoglutarát vstupuje do citrátového cyklu, kde je později v podobě malátu oxidován malát dehydrogenázou, tzv. jablečným enzymem, za současné redukce NADP^+ . Glutamin kromě toho slouží i jako zdroj pro glutathionu či syntézu lipidů (Son et al., 2013).



Obr. 11: Schéma některých deregulovaných metabolických drah v rakovinné buňce, na kterých mají mitochondrie podíl. ECM (extracelulární matrix), VDAC (přenašeč aniontů ovládaný napětím), ANT (nukleotidový přenašeč), HK (hexokináza), GLUT1, GLUT4 (glukózové přenašeče), G-6-P (glukóza-6-fosfát), PFK (fosfofruktokináza), LDHA (laktát dehydrogenáza) MAE („jablečný enzym“), PDK (pyruvát dehydrogenáza kináza), PDH (pyruvát dehydrogenáza), AcCoA (acetyl koenzym A), α -KG (α -ketoglutarát), ERK (kinázy aktivované extracelulárními signály), AMPK (AMP aktivovaná protein kináza), PI3K (fosfatidylinositol-3-kináza), Myc (tumor supresor, z angl. *myelocytomatosis oncogene*), p53 (tumor supresor p53), HIF-1 (faktor indukovaný hypoxií 1), ROS (reaktivní kyslíkové radikály), PPP (pentózofosfátová dráha), TCA (citrátový cyklus), OXPHOS (oxidativní fosforylace).

2.5.2 Deregulace signálů řídících růst a dělení buněk i buněčnou smrt

Schopnost nádorových buněk nekontrolovatelně se dělit je úzce spjata s nabytím neomezené replikační kapacity často pomocí konstitutivní exprese telomerázy, která umožňuje zachovávat délku telomer chromozomů a vyhnout se tak buněčné senescenci, a jejíž katalytická podjednotka zabraňuje permeabilizaci mitochondriální membrány a rozběhnutí v rakovině

nepříliš žádané apoptózy (Massard et al., 2006). K dosažení absolutního proliferčního potenciálu buňky je dále zásadní vyvarovat se pro-apoptotické signalizace, kterou vyvolávají například mitochondriální superoxid dismutáza, p53 či faktor indukující apoptózu AIF, a současně podporovat regulátory zamezující indukci buněčné smrti, jako je jaderný faktor NF- κ B (Hughes, 2005; Jeong, 2006; Kroemer a Pouyssegur, 2008; Ria, 2001). Dříve zmiňovaná asociace HK s VDAC navíc nejspíše zabraňuje narušení mitochondriální membrány charakteristické během apoptózy, a to zřejmě zabráněním tvorby permeabilizačního póru, které se VDAC účastní (Mathupala et al., 2006).

2.5.3 Únik odpovědi imunitního systému

Nádor je výrazný heterogenní útvar zahrnující i nerakovinné buňky. Mezi ně patří také buňky imunitního systému, které reagují na povrchové molekuly, například proteiny teplotního šoku HSP post-translačně modifikované v mitochondriích a vystavované na povrchu umírajících nádorových buněk, jež navíc slouží i jako ochrana vůči oxidativnímu stresu a nedostatku živin (Calderwood a Ciocca, 2008). Nádorové buňky se s potenciální hrozbou aktivace adekvátní imunitní odpovědi dokáží vypořádat například nadměrnou expresí těchto proteinů. Vydatnou produkcí laktátu se navíc snižuje cytosolické pH, a tak rakovinné buňky aktivují iontové membránové transportéry, například Na^+/H^+ antiporter, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ výměník závislý na Na^+ nebo V-ATP syntázu, které pumpují protony do ECM (Izumi et al., 2003). Výrazně se proto okyseluje nádorové mikroprostředí, čímž je mimo jiné inhibována aktivita cytotoxických T-lymfocytů nebo přirozených zabíječů, NK buněk. Díky tomu nejenže jsou rakovinné buňky chráněny před buněčnou smrtí, kterou by nádorové mikroprostředí podnítilo, ale navíc je navozena i zánětlivá imunitní odpověď, jež rozvoji rakoviny napomáhá (Fischer, 2007).

2.5.4 Angiogeneze, infiltrace tkání a metastáze

Kromě buněk imunitního systému se v nádoru nachází endoteliální buňky ovlivňující angiogenezi či buňky stromální, které tvoří podpůrnou tkáň pro nádor. Novotvorba cév je dalším ze stěžejních znaků tumorigeneze (Hanahan a Weinberg, 2011). S růstem nádoru se totiž některé buňky ocitají v hypoxickém prostředí, s velmi nízkou koncentrací kyslíku a živin, ve kterém by nemohly přežít. A proto HIF-1 faktor například ve spolupráci s poškozeným Myc proteinem aktivuje expresi endoteliálního růstového faktoru, jenž rekrutuje buňky do nově vznikajících cév (Pouyssegur et al., 2006). Bylo dokonce prokázáno, že oxidativní stres

podporuje buňky stromatu k autofagii vlastních mitochondrií, tzv. mitofagii, která je v důsledku toho nutí k aerobní glykolýze, a tudíž i produkci laktátu a dalších látek, jež rakovinné buňky ochotně využívají (Pavlidis et al., 2010).

Aktivace HIF-1 faktoru navíc způsobuje potlačení exprese adhezních molekul, především epiteliálního E-kadherinu, zajišťujících mezibuněčný kontakt. To je významný počáteční podnět epiteliálně-mezenchymální přeměny, která za přispění dalších procesů, například aktivace lysyl oxidázy a transkripčního faktoru Snail, zajišťuje buňkám schopnost prostupovat do jiných tkání, kde následně mohou vytvářet sekundární nádorová ložiska (Kroemer a Pouyssegur, 2008; Pouyssegur et al., 2006).

2.6 Mitochondrie jako cíl léčby nádorových onemocnění

Odhalováním komplexní úlohy mitochondrií v regulaci energetického metabolismu, redoxní rovnováhy buňky, buněčné signalizaci a v komunikaci mitochondriálních proteinů s faktory, které ovlivňují genovou expresi, začaly v poslední době tyto orgány přitahovat čím dál více pozornosti pro své možné efektivní využití jako cíle v nádorové terapii. Dnes již víme například ze studií rakoviny pankreatu, že nádorová onemocnění se mohou lišit výskytem genových mutací dokonce i u jednotlivých pacientů a k nádorové transformaci tak může docházet různými mechanismy (Jones et al., 2008). Současně však můžeme evidovat velké množství studií, které prokazují menší i větší změny mitochondriální funkce v rakovinných buňkách takřka u všech typů nádorů, což ukazuje na důležitou roli mitochondrii jako zásahového místa pro nové protirakovinné látky.

Látky cílené do mitochondrií, souhrnně označované jako mitokany (z angl. „*mitochondria*“ a „*cancer*“) využívají tohoto potenciálu a destabilizaci mitochondrií prostřednictvím interakcí s HK, proteiny rodiny Bcl-2, redoxními regulátory, komplexy dýchacího řetězce, lipofilními kationty na IMM, enzymy citrátového cyklu nebo mtDNA; tyto molekuly poměrně selektivně zabíjejí nádorové buňky (Neužil et al., 2013; Ralph et al., 2006). Některé z těchto látek jsou již ve fázích pre-klinických či klinických testů vývoje nových léčiv proti různým typům rakovinných onemocnění, včetně rakoviny prsu, prostaty nebo lymfomu a malobuněčného karcinomu plic. Jsou jimi například navitoclax, analog BH3 domény proteinů Bcl-2, dále 4-(N-(S-glutathionylacetyl)amino)fenylarsenoxid (GSAO), který inaktivuje ANT přenašeč nebo α -tokoferyl sukcinát (α -TOS) interagující s ETC (Gandhi et al., 2011; Neužil et al., 2001; Ralph, 2009).

Látky modifikované delokalizovaným kationtem trifenyfosfoniem (TPP⁺)

TPP⁺ je lipofilní kation, jenž se vzhledem k negativnímu mitochondriálnímu membránovému potenciálu (MMP), který mají nádorové buňky výrazně snížený (až -220 mV) oproti buňkám nemaligním (~140 mV) hromadí v matrix mitochondrií, kam vzhledem ke svému delokalizovanému náboji poměrně snadno prostupuje. Díky tomu může zejména nespecifickými interakcemi s ETC zvyšovat propustnost mitochondriální membrány vedoucí k poklesu tvorby ATP a případně i k buněčné smrti. Přestože lipofilní kationty nepoškozují DNA, a jejich působení tedy není tak radikální jako je známo pro některá zavedená chemoterapeutika, mohou se kromě nádorových buněk akumulovat v menším množství i ve zdravých buňkách (Murphy, 1997).

Selektivitu a protinádorový účinek lze navýšit využitím lipofilních kationtů jako přenašečů bioaktivních molekul, jež samotné do mitochondrií navíc vstupují velmi obtížně. Úspěch této strategie byl potvrzen vytvořením derivátů lipofilních kationtů s antioxidanty, například mitochondriálně směřovaný CoQ (MitoQ) či mitochondriálně směřovaný vitamin E (MitoE), které zamezují oxidativnímu poškození buňky především snižováním hladiny ROS (Sheu et al., 2006). V důsledku toho tyto látky významně potlačují aktivitu apoptózy iniciující kaspázy 3, obnovují přirozený MMP nebo zabraňují peroxidaci lipidů a DNA fragmentaci (Sheu et al., 2006). *In vivo* nejsou konjugáty TPP⁺ metabolizovány, zůstávají ve své aktivní formě a při dlouhodobém orálním podávání se v závislosti na délce alkylového řetězce rovnoměrně vstřebávají během několika dnů, přičemž injekce do peritonea i intravenózní aplikace se přirozeně ukazují jako rychlejší způsob aplikace (Porteous et al., 2010; Smith et al., 2003). Zavedení dobře uvážených specifických látek do mitochondrií prostřednictvím TPP⁺ tak nabízí velmi efektivní způsob obrany buněk nejen proti nádorové transformaci, ale také například proti ischemickým chorobám a proti jiným patologiím souvisejícím s mitochondriální dysfunkcí.

2.6.1 Mitokany interagující s komplexy dýchacího řetězce

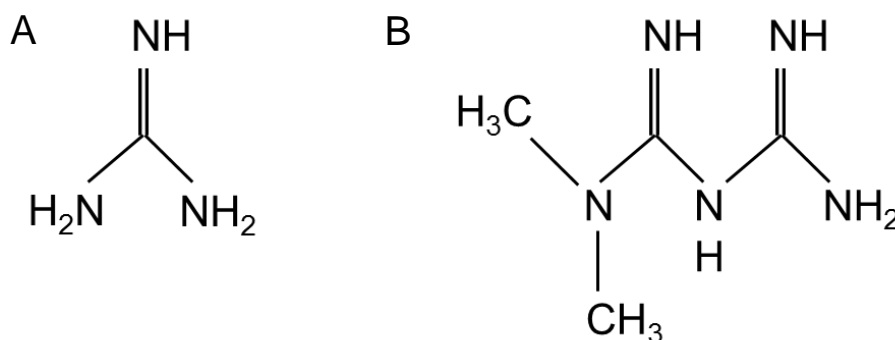
Za běžných podmínek vznikají při transportu elektronů ETC, především na úrovni komplexů I a III, kyslíkové radikály, jejichž hladina je pomocí antioxidačních systémů zachovávána na nízké úrovni. Náhlá a výrazná změna v tvorbě ROS pak stimuluje buňku k zahájení programované buněčné smrti (Behrend et al., 2003). Oproti tomu jsou rakovinné buňky vlivem hypoxického prostředí a změnám v mitochondriální funkci téměř trvale vystavované oxidativnímu stresu, který antioxidační systémy z důvodu vyčerpání své kapacity již nedokáží eliminovat. I přes nadměrné množství produkovaných ROS si však určitou pozměněnou redoxní rovnováhu udržují, což jim umožňuje i nadále přežít a přispívat k nádorové transformaci. Jsou proto ovšem mnohem náchylnější k buněčné smrti vyvolané eventuálním dalším navyšováním hladiny ROS (Behrend et al., 2003; Kong et al., 2000; Trachootham et al., 2009). A právě mitokany působící na komplexy dýchacího řetězce této zranitelnosti využívají k selektivní eliminaci nádorových buněk (Ralph et al., 2006; Rohlena et al., 2012).

Dosud studovanými látkami této skupiny je například resveratrol, molekula pravděpodobně soutěžící s CoQ o vazebné místo na komplexech I a III a inhibující F_1 podjednotku ATP syntázy, nebo 3-bromopyruvát, jenž znemožňuje funkci komplexu II interakcí s jeho A podjednotkou a také tlumí aktivitu mitochondriální HK. Velmi nadějný je dále tamoxifen, který indukuje apoptózu působením na FAD vazebné místo komplexu I a následným zvýšením hladiny H_2O_2 , nebo α -TOS a jeho analog MitoVES, jenž především interakcí s CoQ redukcí doménou komplexu II zvyšuje produkci ROS a efektivně potlačuje i růst nádorů *in vivo* (Dong et al., 2011; Ko et al., 2004; Moreira et al., 2006; Neuzil et al., 2001; Ralph, 2009). Zda skutečně tyto i další mitokany naplní slibné vyhlídky, však ještě nelze s jistotou říci, neboť klinické testy mnohých z nich jsou teprve ve svých počátcích.

2.6.2 Biguanidy

Mezi mitokany lze zařadit i skupinu biguanidů, hydrofilních látek sestávajících ze dvou guanidinových molekul (Obr. 12A, s. 33) propojených iminovou vazbou, které jsou obsaženy v *Galega officinalis*. Léčivé účinky této rostliny byly využívány po stovky let pro zmírnění příznaků dnes spojovaných s projevem DM2, ale až ve 20. století byla skutečně hypoglykemická aktivita guanidinu po subkutánním podávání králíkům prokázána (Watanabe, 1918). Pro často se projevující a poměrně rizikovou laktoacidózu, kterou guanidin a některé jeho deriváty vyvolávaly, byla nicméně v léčbě diabetu dána přednost bezpečnějším analogům,

zejména inzulinu. A tak i přesto, že biguanidy, včetně takřka netoxického metforminu (Obr. 12B), byly k léčbě DM2 doporučeny již v 60. letech 20. století, až v roce 1995, kdy byla terapie DM2 pomocí metforminu schválena, začal tento biguanid nabývat na významu (Bailey a Day, 2004). Od té doby se metformin stal nejčastěji užívanou látkou pro léčbu DM2, byly postulovány mnohé hypotézy jeho účinků na molekulární i systémové úrovni, a také byla odhalena možnost jeho potenciálního využití v nádorové terapii či při léčbě kardiovaskulárních chorob (Pryor a Cabreiro, 2015).



Obr. 12: Chemická struktura (A) molekuly guanidinu a (B) metforminu, 1,1-dimethylbiguanidu

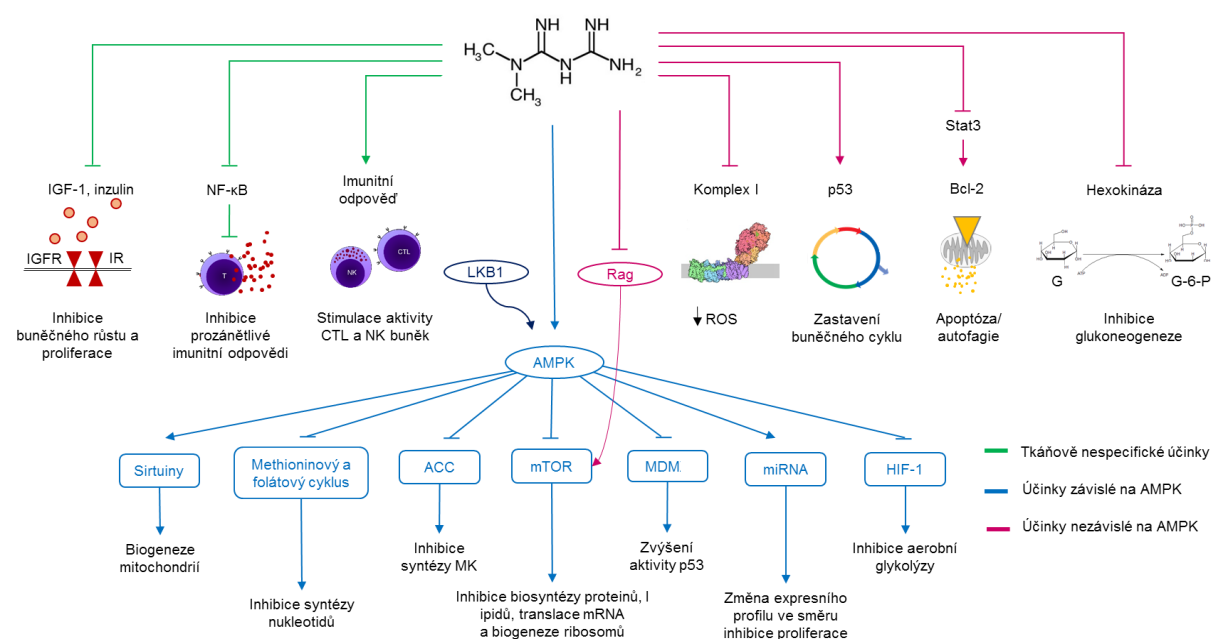
Metformin

Protinádorové účinky metforminu byly poprvé prezentovány při sledování vlivu diety s vysokým obsahem tuků na rozvoj rakoviny pankreatu (Schneider et al., 2001). Následně se začalo objevovat rostoucí množství retrospektivních studií, které poukazovaly na sníženou incidenci maligních nádorů u pacientů léčených s DM2 právě pomocí metforminu. Dnes již probíhají desítky klinických testů, jež ověřují účinnost metforminu v nádorové terapii jak samostatně tak v kombinaci s chemoterapií či ozařováním (Chae et al., 2016).

Na základě předpokládané inhibice komplexu I dýchacího řetězce pomocí metforminu, spočívá patrně mechanismus jeho působení v aktivaci LKB1/AMPK/mTOR dráhy, ale dále i v regulaci jiných metabolických procesů na AMPK nezávislých včetně inzulinové signalizace nebo oxidativního stresu (Obr. 13, s. 34) (El-Mir, 2000; Owen et al., 2000).

AMPK funguje jako molekulární přepínač mezi buněčnými pochody, které ATP spotřebovávají, a pochody, které jej naopak produkují, čímž udržuje energetickou rovnováhu buňky. V důsledku působení metforminu na komplex I dochází ke změně poměru koncentrace ATP/AMP ve prospěch AMP, na což AMPK stimulovaná prostřednictvím LKB1 reaguje

aktivační fosforylací tumor supresorového proteinu TSC2, jež vede k inhibici proteinu mTOR. Tímto způsobem metformin v rakoviných buňkách nejen zamezuje rozsáhlé mTOR signalizaci ale také nadměrné stimulaci PI3K/LKB1 dráhy. Mimo to metforminem aktivovaná AMPK negativně ovlivňuje syntézu mastných kyselin, a také methioninový a folátový cyklus, jejichž meziproducty se účastní syntézy nukleotidů, a aktivitu HIF-1 faktoru, čímž potlačuje expresi glykolytických enzymů a s tím související aerobní glykolýzu (Cantoria et al., 2014; Corominas-Faja et al., 2012; Faubert et al., 2013). Aktivní AMPK navíc fosforyluje sirtuiny, proteiny, které přispívají k rezistenci na chemo- i radioterapii pankreatických rakoviných linií, a přispívá ke změně expresního profilu včetně miRNA nádorových kmenových buněk (Lonardo et al., 2013; Zhang et al., 2014). Na modelu rakoviny prsu byla například odhalena snížená exprese onkogenu Myc pomocí miR-33a interference (Blandino et al., 2012). AMPK může také rozhodovat o zahájení autofagie případně buněčné smrti stabilizací p53 (Liang et al., 2007).



Obr. 13: Zjednodušené schéma protirakovinných účinků metforminu. IGF-1 (růstový faktor, z angl. *insuline-like growth facfactor*), IGFR (receptor IGF-1), IR (inzulinový receptor), NF-κB (jaderný faktor Kb), CTL (cytotoxické T-lymfocyty), NK buňky (z angl. *natural killer*), ROS (reaktivní kyslíkové radikály), p53 (tumor supresor p53), Stat3 (přenašeč signálu a transkripčních faktorů 3), Bcl-2 (apoptotické regulátory, z angl. *B-cell lymphoma-2*), G (glukóza), G-6-P (glukóza-6-fosfát), ACC (acetyl koenzym A karboxyláza), mTOR (cílová molekula působení rapamycinu u savců), MDM (ubikvitin ligáza, z angl. *mouse double minute*), miRNA (mikro-RNA), HIF-1 (faktor indukovaný hypoxií 1), AMPK (AMP aktivovaná protein kináza), LKB1 (jaterní kináza B1), Rag (GTPáza Rag). Upraveno dle (Lonadro et al., 2013; Pryor a Cabreiro, 2015).

Metformin je schopen inhibovat mTOR také v nepřítomnosti AMPK pomocí Ras příbuzné GTPázy Rag a umocnit tak touto cestou již zmiňované účinky (Kalender et al., 2010). Snížená mTOR signalizace se ukázala i jako příčina poklesu exprese povrchových markerů

pankreatických kmenových buněk (Mohammed et al., 2013). Dále se například zasluhuje o spuštění apoptotické dráhy přes signalizaci Stat3/Bcl-2, popřípadě snížením hladiny cyklinu D1 zastavuje buněčný cyklus zřejmě stimulací aktivity p53 během odpovědi na poškození DNA (Feng et al., 2014). Avšak právě i poškození DNA je díky metforminem snižené produkci ROS méně rozsáhlé (Algire et al., 2012). Ochranné účinky metforminu se v neposlední řadě zakládají na interakci s inzulinovými receptory, pomocí nichž snižuje koncentraci inzulinu v krvi, nebo s NF- κ B faktorem, kterým tlumí prozánětlivou imunitní odpověď a naopak stimuluje NK buňky nebo cytotoxické T-lymfocyty (Draznin, 2011; Moiseeva et al., 2013).

3 Cíle práce

Cílem této práce bylo objasnit mechanismy působení látky norMitoMet a mateřské látky, metforminu, *in vitro* (model pankreatické rakovinné linie PANC-1 v porovnání s fibroblasty) a *in vivo*.

- Vliv na metabolismus buněk
 - Respirace buněk
 - Aktivita mitochondriálních komplexů
 - Vliv na mitochondriální membránový potenciál
 - Produkce volných radikálů
- Vliv na buněčný cyklus
 - Buněčná smrt
 - Průběh buněčného cyklu
- Vliv na růst nádorů za použití myšího modelu

4 Metody

4.1 Kultivace buněk

Ve všech experimentech byla použita rakovinná buněčná linie PANC-1 (ATCC, American Type Culture Collection). Není-li uvedeno jinak, veškeré materiály byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich.

PANC-1 buňky byly kultivovány při 37°C a 5% koncentraci CO₂ v DMEM médiu (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Lonza) doplněném o 10% fetální hovězí sérum (FBS, Life Technologies), neesenciální aminokyseliny (Life Technologies), 3% L-glutamin a antibiotika (penicilin a streptomycin). Buňky byly pasážovány dvakrát týdně trypsinizací.

4.2 Trypsinizace

Buňky byly opláchnuty fosfátovým puftrem (PBS, Active Motif) a inkubovány v 0,25% roztoku trypsinu v PBS s 0,27 mM kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA, Fluka), při 37°C po dobu asi 5 min. Trypsin byl inhibován přidáním čerstvého média, a získaná suspenze buněk byla použita pro další účely.

4.3 Detekce buněčné smrti

Míra buněčné smrti po aplikaci testovaných látek byla sledována na základě detekce vazby annexinu V konjugovaného s fluorescenční sondou fluorescein isothiokyanátem (FITC, Apronex) pomocí průtokové cytometrie. Během raných fází buněčné smrti, kdy je plazmatická membrána dosud intaktní, dochází mimo jiné k translokaci fosfatidylserinu (PS) z cytosolické strany fosfolipidové dvojvrstvy na stranu extracelulární. Naopak v pozdních fázích apoptózy a při nekróze ztrácí plazmatická membrána svoji integritu, a je tedy prostupná i pro větší/nabité molekuly, například fluorescenční interkalační činidlo propidium jodid (PI, Molecular Probes). Vysokoafinitní vazby fluorescenčně značeného annexinu V na PS v kombinaci s PI tak lze využít při sledování buněk časně (annexin⁺PI⁻) a pozdně (annexin⁺PI⁺) apoptotických, stejně tak jako buněk nekrotických (annexin⁺PI⁺) (Vermes I, 1995).

Buňky byly nasazeny do kultivační destičky a inkubovány s látkami metformin nebo norMitoMet. Po uplynutí inkubační doby 48h či 72 h, byly buňky sklizeny a resuspendovány ve 100 μ l vazebného pufru s 0,3 μ l annexinu V-FITC a převedeny do zkumavek určených pro měření na průtokovém cytometru. Takto připravené vzorky byly 30 min inkubovány ve tmě při teplotě 4°C a bezprostředně před měřením k nim byl přidán 1,5 μ M roztok PI. Fluorescence vzorků byla měřena pomocí průtokového cytometru (FACS Calibur, BD Biosciences) za použití argonového laseru při 488 nm na detekčních kanálech FL1 (pro annexin V, 530/30 nm) a FL3 (pro PI, 585/42 nm).

4.4 Detekce produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS)

Pro zjišťování relativní míry oxidačního stresu bylo využito fluorescenčních činidel 2,7-dichlorodihydrofluorescein acetátu (H₂DCFDA, Cell Signaling Technology) a MitoSOX Red. Oba indikátory tvorby RONS jsou pro membránu propustné a v buňce jsou oxidovány za vzniku fluorescenčních produktů. MitoSOX Red (hydroxyethidin konjugovaný s TPP⁺ kationtem), který se akumuluje především v mitochondriích, reaguje přednostně se superoxidovým radikálem O₂⁻ za vzniku červeného fluorescenčního produktu 2-hydroxymitoethidia (2-OH-mito-E⁺) (Polster et al., 2014). V případě H₂DCFDA, který se hromadí v cytosolu, nejdříve dochází k deacetylaci pomocí esteráz a následující reakcí s některou z reaktivních forem kyslíku nebo dusíku, případně reakcí s H₂O₂ za současného působení metaloproteinů, vzniká zelený fluorescenční produkt dichlorofluorescein, DCF (Halliwell a Whiteman, 2004).

NorMitoMet byl aplikován do jamek kultivační destičky s nasazenými PANC-1 buňkami s časovým odstupem 6, 12, 18 a 24 h před měřením na průtokovém cytometru. Po 15 min inkubace buněk s H₂DCFDA o výsledné koncentraci 0,5 a 5 μ M byly buňky sklizeny, převedeny do zkumavek určených pro měření na průtokovém cytometru a resuspendovány ve 100 μ l PBS. Fluorescence byla změřena pomocí průtokového cytometru za použití argonového laseru při 488 nm na detekčním kanálu FL1 (pro H₂DCFDA, 530/30 nm).

Pro měření produkce RONS pomocí sondy MitoSOX Red byly PANC-1 buňky inkubovány 15 min v přítomnosti 1,25 μ M luorescenční sondy. Fluorescence připravených vzorků byla změřena pomocí průtokového cytometru za použití argonového laseru při 488 nm na detekčním kanálu FL3 (pro MitoSOX Red, 585/42 nm).

4.5 Detekce změny mitochondriálního membránového potenciálu

Změna mitochondriálního membránového potenciálu byla určována za použití 50 nM fluorescenční barvy tetramethylrhodamin methylesteru (TMRM), jenž se díky svému pozitivnímu náboji akumuluje v mitochondriích. S poklesem mitochondriálního membránového potenciálu ztrácí mitochondrie schopnost TMRM zadržovat, což se projevuje na intenzitě detekovatelné fluorescence této barvy. Intenzita TMRM signálu byla měřena pomocí průtokového cytometru prostřednictvím argonového laseru při 488 nm na detekčním kanálu FL3 (pro TMRM, 585/42 nm).

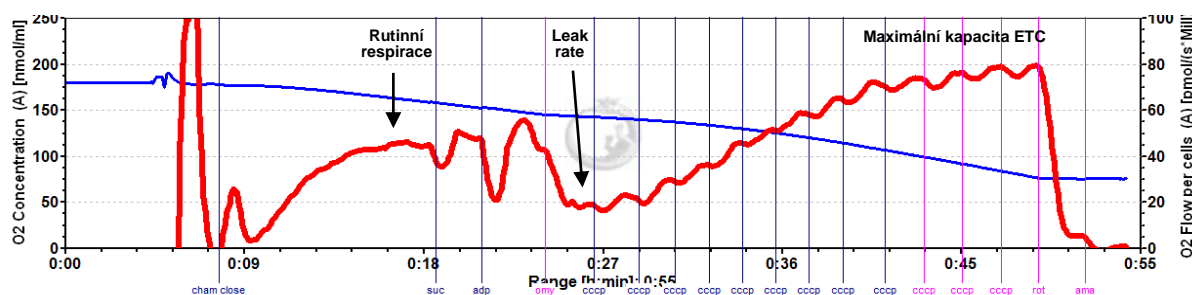
4.6 Měření respirace

Respirace byla měřena metodou respirometrie s vysokým rozlišením pomocí přístroje Oxygraph-2k (Oroboros) na intaktních nebo permeabilizovaných buňkách.

Rutinní respirace odráží přibližný fyziologický stav mitochondrií za aerobních podmínek. Intaktní buňky respirují za využití endogenních substrátů, případně mohou transportovat některé látky z kultivačního média. Narušením plazmatické membrány, neboli permeabilizací, dochází naopak k vyplavení cytosolických substrátů pro ETC. Díky tomu lze však pozorovat respiraci zprostředkovanou jednotlivými komplexy a určit tak jejich aktivitu. Kapacitu dýchacího řetězce lze určit použitím rozpřahovače mitochondriálního membránového potenciálu, který stimuluje ETC k maximální aktivitě (protonofor karbonyl kyanid m-chlorofenyl hydrazon, CCCP). Zbytková respirace buněk po inhibici komplexu I a III pomocí rotenonu a antimycinu je způsobena především spotřebou kyslíku mimo mitochondrie (Gnaiger, 2008).

4.6.1 Měření respirace na intaktních buňkách

Buňky byly po uplynutí inkubační doby sklizeny a resuspendovány v kultivačním DMEM médiu. Získaná suspenze $2,5 \times 10^6$ buněk byla převedena do komůrky Oxygrafu temperované na 37°C , která byla poté uzavřena. Následně byly do komory přidávány jednotlivé substráty a inhibitory dýchacího řetězce (Obr. 14): sukcinát (10 mM), ADP (3 mM), oligomycin (4 mg/ml), CCCP (titrace v $0,25\mu\text{M}$ krocích do maximální koncentrace $4\mu\text{M}$), rotenon (1 mM) a antimycin (0,5 μM).

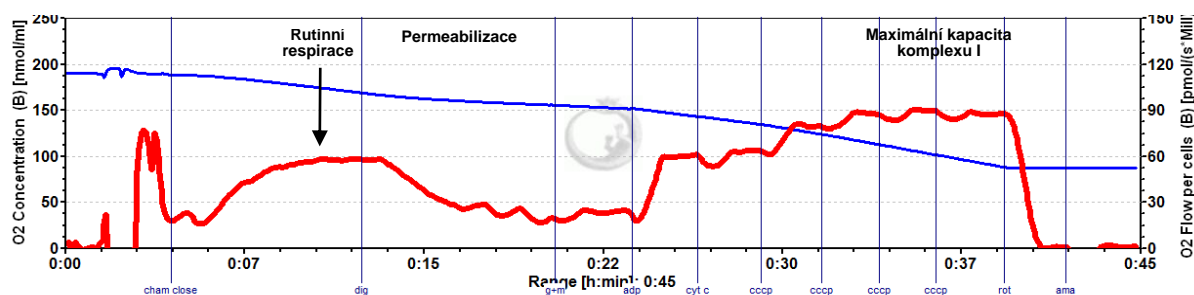


Obr. 14: Záznám z měření respirace intaktních buněk. Po uzavření komůrky oxygrafu (cham close) buňky vykazují rutinní respiraci. Použitím oligomycinu (omy) je inhibována ATP syntáza a respirace mitochondrií se projevuje tzv. leak rate. Aplikací CCCP dochází k disipaci membránového potenciálu, a stimulaci ETC k maximální aktivitě. Respirace je v posledním kroku inhibována rotenonem (rot) a antimycinem (ama). Při měření byl dále použit sukcinát (suc) a ADP. Modrá křivka zobrazuje koncentraci kyslíku v komůrce Oxygrafu.

Neporušenost cytoplazmatické membrány byla kontrolována pomocí sukcinátu a ADP, jež by vzhledem ke své velikosti a chemické povaze neměly volně prostupovat membránou a ovlivnit mitochondriální respiraci. Oligomycin svým působením na ATP syntázu inhibuje buněčné dýchání s endogenními substráty. Přesto může být u buněk zřetelná určitá míra respirace, tzv. leak rate, což způsobuje snaha ETC vyrovnat se s tokem protonů přes IMM. Kapacita elektronového transportního řetězce v mitochondriích buněk ovlivněných testovanou látkou a bez ní byla určena za použití rozpřahovače protonového gradientu CCCP. Respirace buněk byla inhibována rotenonem a antimycinem A.

4.6.2 Měření respirace na permeabilizovaných buňkách

Po uplynutí inkubační doby byly buňky sklizeny a resuspendovány ve 2,5 ml MIR05 média (0,5 mM kyselina ethylenglykoltetraoctová, EGTA, 3 mM MgCl_2 , 60 mM K-laktobionát, 20 mM taurin, 10 mM KH_2PO_4 , 110 mM sacharóza, 1 g/l hovězí sérový albumin bez přidávaných esenciálních mastných kyselin, 20 mM hepes, pH 7,1, 30°C) a získaná suspenze $2,5 \times 10^6$ buněk byla přenesena a uzavřena v komůrce Oxygrafu temperovaném na 37°C. Po ustálení signálu rutinní respirace s endogenními substráty byla pomocí digitoninu ($10 \mu\text{g}/10^6$ buněk) permeabilizována plazmatická membrána. Následně byly do uzavřené komůrky přidávány jednotlivé substráty a inhibitory specifické pro komplex I nebo II ETC. Pro komplex I (Obr. 15): glutamát a malát (10 mM a 2 mM), ADP (3 mM), cytochrom c ($10 \mu\text{M}$), CCCP (titrace v $0,5 \mu\text{M}$ krocích do maximální koncentrace $2 \mu\text{M}$), rotenon (1 mM) a antimycin ($0,5 \mu\text{M}$). Pro komplex II: rotenon (1 mM), sukcinát (10 mM), ADP (3 mM), cytochrom c ($10 \mu\text{M}$), CCCP (titrace v $0,5 \mu\text{M}$ krocích do maximální koncentrace $2 \mu\text{M}$) a antimycin ($0,5 \mu\text{M}$).



Obr. 15: Záznam z měření respirace permeabilizovaných buněk. Po uzavření komory oxygrafu (cham close) buňky vykazují rutinní respiraci. Použitím digitoninu (dig) dochází k permeabilizaci plazmatické membrány. Následně byly přidány substráty pro komplex I, glutamát a malát (g+m), ADP pro ATP syntázu a cytochrom c (cyt c) pro ověření stavu OMM. Aplikací CCCP dochází k disipaci membránového potenciálu, a stimulaci maximální respirace prostřednictvím komplexu I. Respirace je v posledním kroku inhibována rotenonem (rot) a antimycinem (ama). Modrá křivka zobrazuje koncentraci kyslíku v komoře oxygrafu.

Integrita OMM byla testována cytochromem c, jehož použití by v případě narušené vnější mitochondriální membrány zvýšilo mitochondriální respiraci. Aktivita komplexu I byla sledována přidáním glutamátu a malátu, pomocí nichž dochází k podpoření chodu citrátového cyklu ve směru redukce molekul kofaktoru NAD^+ , které jsou využívány zvláště tímto komplexem. Naopak použitím rotenonu a přidáním sukcinátu do reakční směsi, byl stimulován tok elektronů komplexem II redukcí kofaktoru FAD. Pro chod oxidativní fosforylace bylo dále nutné přidat ADP jako substrát pro ATP syntázu. Přidáním protonoforu CCCP pak bylo možné zvlášť sledovat výkonnost obou komplexů. Respirace buněk byla inhibována rotenonem a antimycinem A.

4.7 Experimentální zvířecí model

Ke sledování vlivu biguanidů na zvířecím modelu byly použity samice nahých Balb/c *nu-nu* myši, kterým bylo subkutánně injikováno 2×10^6 PANC-1 buněk ve 100 μ l suspenzi. Testovaný analog metforminu (72 mg/kg), metformin (250 mg/kg) nebo voda byly myším podávány gaváží (100 μ l) 3x týdně po dobu 21 dnů od počátku růstu nádorů.

Velikost nádorů byla 2x týdně sledována pomocí ultrazvukové zobrazovací metody za použití přístroje Vevo 770 (VisualSonics). Myši byly uspány pomocí inhalační anestetické směsi izofluranu a kyslíku, poté byly touto směsí nadále udržovány ve spánku na vyhřívaném stolku. Nádory byly skenovány po nanesení ultrazvukového gelu sondami RMV704 případně RMV708 s frekvencí 25 – 55 MHz a získaná data byla dále zpracována pomocí specifického softwaru.

4.8 Vyhodnocování výsledků a statistická analýza

Výsledky z cytometrických měření byly zpracovávány v programu FlowJo 9.6.2. Zastoupení apoptotických buněk bylo stanoveno z výstupního grafu součtem kvadrantů populací annexin⁺PI⁻ a Annexin⁺PI⁺ buněk. Relativní produkce RONS stejně jako změna mitochondriálního membránového potenciálu byla určena geometrickým průměrem signálu použité sondy. Respirace buněk byla vypočtena derivací změny koncentrace kyslíku v uzavřené komůrce Oxygrafu pomocí programu Oroboros Datlab. Objem nádorů byl vyhodnocen pomocí programu Vevo 770 (VisualSonics).

Veškeré uvedené výsledky jsou průměrem minimálně tří nezávislých měření a zobrazené odchylky jsou střední chybou průměru (\pm SEM). Získaná data byla podrobena statistické analýze v programu GraphPad Prism 6 testem mnohonásobného porovnávání analýzy rozptylu, one-way ANOVA, Dunett-test, s hladinou významnosti 0,05.

ns $p > 0,05$ (statisticky nevýznamný rozdíl)

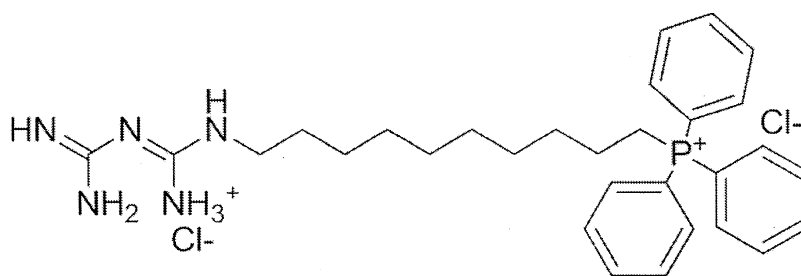
* $p < 0,05$ (statisticky významný rozdíl)

** $p < 0,01$ (statisticky vysoce významný rozdíl)

*** $p < 0,001$ (statisticky extrémně významný rozdíl)

5 Výsledky

Naše laboratoř navrhla a ve spolupráci s kolegy z Vysoké školy chemicko-technologické v Praze nasyntetizovala modifikované formy metforminu, z nichž jako nejúčinnější se ukázala varianta s TPP⁺ navázaným na metformin prostřednictvím deseti uhlíkatého řetězce, tzv. norMitoMet (Obr. 16).



Obr. 16: Chemická struktura látky norMitoMet.

Cílem této práce bylo objasnit mechanismy působení látky norMitoMet a jeho mateřské látky, metforminu, *in vitro*, na modelu pankreatické rakovinné linie PANC-1 a fibroblastů, a *in vivo* za pomoci myšího modelu. Vzhledem k předpokládanému působení metforminu na mitochondriální komplex I a chemické povaze TPP⁺ jsme se zaměřili na identifikaci mechanismů, jako je schopnost obou látek vyvolat buněčnou smrt, oxidativní stres nebo ovlivnit mitochondriální funkci, jež skýtají velký potenciál v boji s rakovinotvornými buňkami.

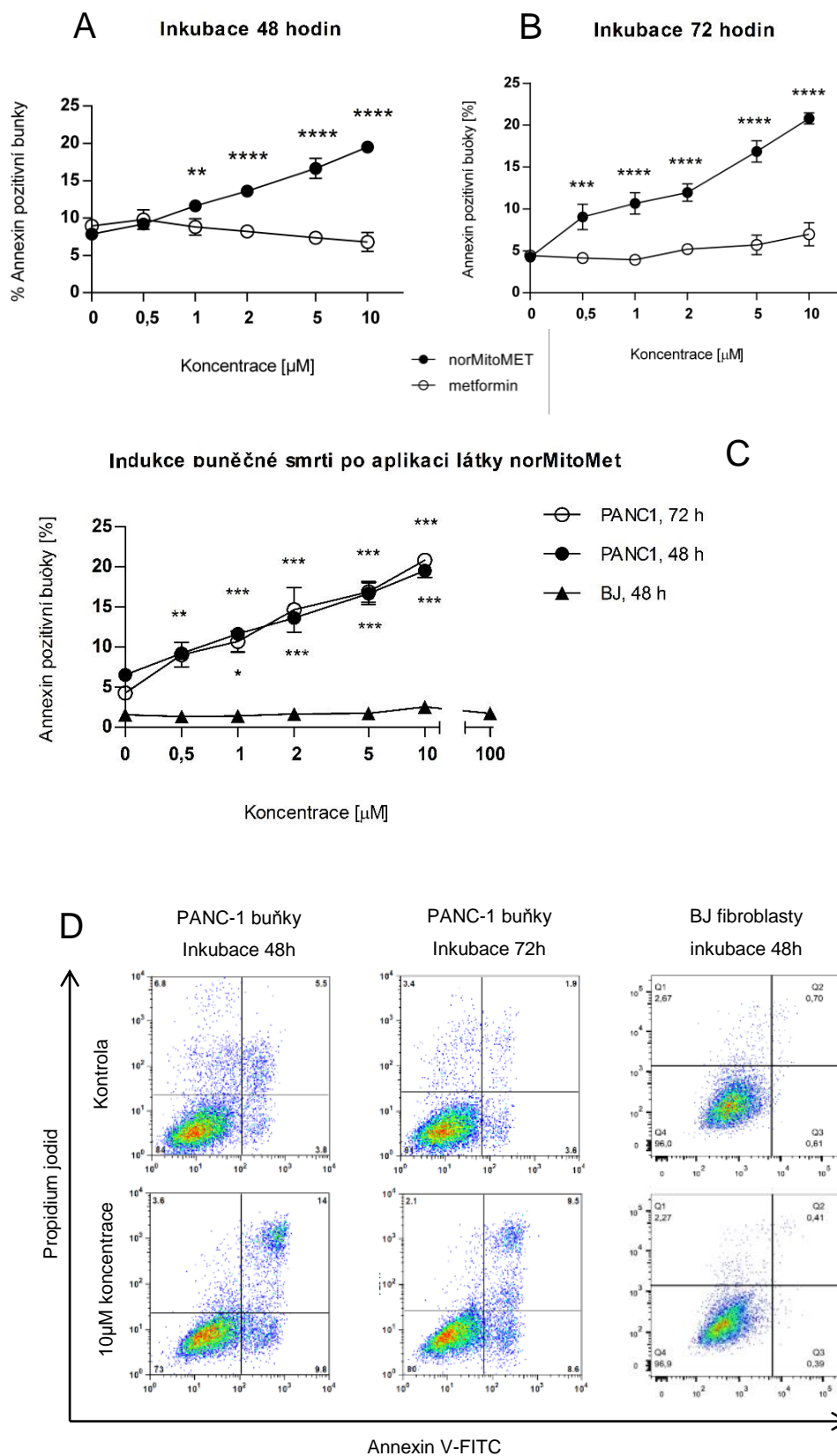
V předchozích pokusech byla studována odpověď několika pankreatických rakovinných linií, mezi nimiž jde například o buňky BxPc3, MiaPaCa2, PANC-1 či PaTu 8902, na metformin a odvozené látky, MitoMet, C6-MitoMet a norMitoMet metodou krystalové violeti a pomocí přístroje xCelligence. Dle hodnoty IC₅₀ byla nejcitlivější linií vůči všem analyzovaným látkám vyhodnocena buněčná linie PANC-1 linie, která byla proto zvolena jako výchozí model pro další experimenty. Z testovaných analogů metforminu se nejlépe osvědčil norMitoMet, který účinně působil v koncentracích o 3 až 4 řády nižších než mateřská látka.

5.1 Navození buněčné smrti

Vzhledem k výsadní roli mitochondrií v řízení programové buněčné smrti jsme testovali schopnost látky norMitoMet ovlivnit životaschopnost PANC-1 rakovinných buněk v porovnání s nerakovinnými buňkami, lidskými kožními BJ fibroblasty metodou průtokové cytometrie za použití sondy annexin V-FITC detekující apoptózu. Touto metodou jsme rovněž chtěli ověřit primární selektivitu látky norMitoMet pro rakovinné buňky.

Aplikace látky norMitoMet vedla k indukci apoptózy u rakovinných buněk PANC-1 (Obr. 17, s. 45). Signifikantní navýšení zastoupení apoptotických buněk jsme zaznamenali za použití 1 μM a vyšší koncentrace látky norMitoMet aplikované po dobu 48 h. Při prodloužení doby inkubace na 72 h byla míra apoptózy zvýšena již při aplikaci 0,5 μM testované látky. Nejvyšší použitá koncentrace látky norMitoMet - 10 μM - způsobila navýšení množství apoptotických buněk o přibližně 15% nezávisle na inkubační době 48 a 72 h. Metformin použitý ve stejných dávkách jako norMitoMet žádný vliv na míru apoptózy neměl.

Abychom stanovili účinky látky norMitoMet na životaschopnost nerakovinných buněk, zopakovali jsme experimenty s využitím linie BJ fibroblastů. U této buněčné linie jsme nezaznamenali žádné signifikantní navýšení zastoupení apoptotických buněk, a to ani při použití 100 μM koncentraci látky norMitoMet..

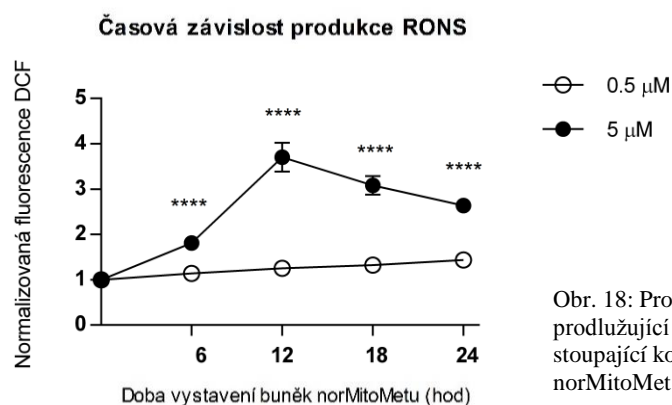


Obr. 17: Výsledky cytometrického měření detekce buněčné smrti. Koncentrační závislost indukce apoptózy při použití látek norMitoMet a metformin po 48 (A) a 72 h (B). (C) Porovnání schopnosti zvyšujících se koncentrací látky norMitoMet indukovat buněčnou smrt u PANC-1 buněk po 48 a 72 h a u BJ fibroblastů po 48 h. (D) Grafický výstup z cytometrického měření detekce buněčné smrti. Q1: populace živých buněk (annexin⁻PI⁻), Q2: populace časně apoptotických buněk (annexin⁺PI⁻), Q3: populace pozdně apoptotických buněk (annexin⁺PI⁺), Q4: populace nekrotických buněk (annexin⁻PI⁺).

5.2 Tvorba reaktivních forem kyslíku a dusíku

Na základě TPP⁺ modifikace, která se v naší laboratoři osvědčila již při testování látky MitoVES, jsme předpokládali podobný dopad na mitochondriální funkci též u látky norMitoMet. K vyšetřování vlivu této látky na redoxní rovnováhu pankreatických rakovinných buněk jsme zvolili metodu průtokové cytometrie za použití sondy H₂DCFDA zaznamenávající hladinu reaktivních forem kyslíku a dusíku.

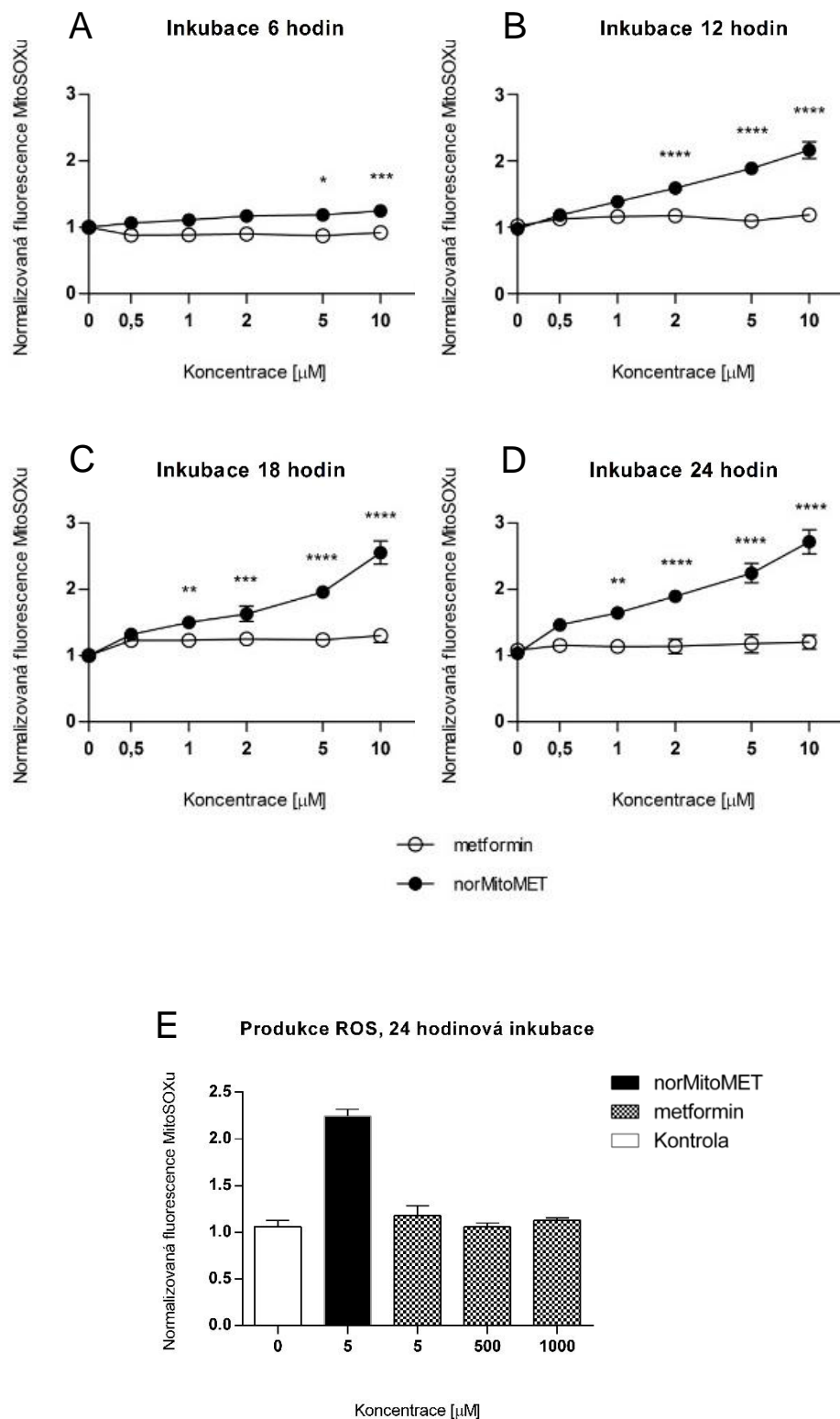
Z naměřených výsledků shrnutých v grafu (Obr. 18) je patrné, že inkubace buněk s již 5 μ M koncentrací látky norMitoMet způsobuje po šesti hodinách podstatný nárůst hladiny RONS. Zajímavé je, že s prodlužující se inkubační dobou produkce RONS neroste přímou úměrou, avšak za použití 5 μ M koncentrace látky norMitoMet vrcholí po 12 h působením a dále se již účinek nezvyšuje.



Obr. 18: Produkce RONS po prodlužující se inkubaci buněk se stoupající koncentrací látky norMitoMet.

Nejčastějším místem vzniku radikálů, obzvláště velmi reaktivního superoxidového radikálu ($O_2^{\cdot-}$), který se tvoří předčasným únikem elektronů z redoxních center dýchacího řetězce na kyslík, je spolu s komplexem III rovněž komplex I, předpokládané místo působení obou testovaných látek. Kromě zmiňovaného H₂DCFDA jsme proto zvolili i fluorescenční činidlo specifické právě pro $O_2^{\cdot-}$, MitoSOX Red.

Následující grafy (Obr. 19, s. 47) dokumentují zřejmou tendenci zvyšování tvorby ROS se zvyšující se použitou koncentrací látky norMitoMet, a také v závislosti na prodlužující se inkubační době. Například již 1 μ M koncentrace po 18 h významně narušuje redoxní rovnováhu v buňce, zato ani v případě použití 1 mM metforminu se po 24 h hladina ROS nikterak nezvýšila (Obr. 19E, s. 47).



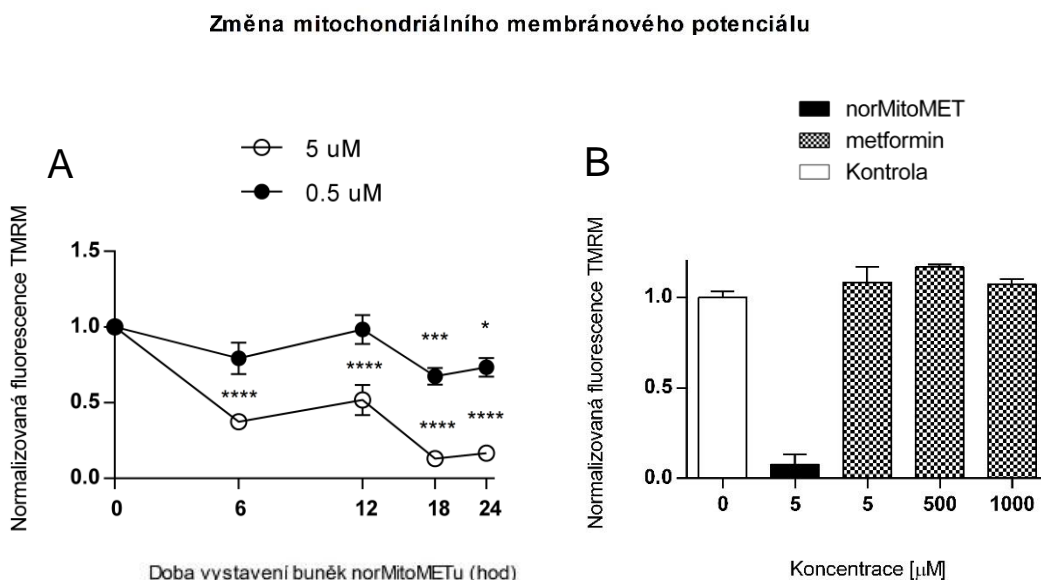
Obr. 19: Výsledky cytometrického měření detekce reaktivních kyslíkových radikálů sondou MitoSOX Red. (A-D) Produkce ROS po aplikaci stoupajících koncentrací metforminu a norMitoMETu detekovaná sondou MitoSOX Red po různě dlouhou inkubační dobu. (E) Hladina ROS bez aplikované látky (kontrola) a po 24 h inkubaci buněk s 5 μ M norMitoMETem a zvyšující se koncentrací metforminu.

5.3 Změna mitochondriálního membránového potenciálu ($\Delta\Psi_m$)

Negativní hodnoty mitochondriálního membránového potenciálu jsou indikátorem funkčních a zdravých mitochondrií, neboť MMP je nezbytný k tvorbě ATP, udržování iontové homeostázy či regulaci buněčné smrti. Jeho výrazná změna silně omezuje schopnost mitochondrií tvořit pro buňky potřebnou energii.

Ke sledování $\Delta\Psi_m$ jsme použili fluorescenční lipofilní sondu TMRM, která se v matrix mitochondrií hromadí tím více, čím polarizovanější je mitochondriální membrána. K ověření $\Delta\Psi_m$ byly použity kontrolní vzorky bez jakékoliv aplikované látky představující přirozený elektrický gradient a vzorky inkubované s protonoforem CCCP, jejichž $\Delta\Psi_m$ sloužila jako krajní hodnota depolarizovaných mitochondrií.

V souladu s předchozími výsledky měření produkce RONS jsme zaznamenali významný pokles $\Delta\Psi_m$ také již po 6 h působení 5 μM látky norMitoMet (Obr. 20A). K hypopolarizaci mitochondriální membrány naopak nedocházelo ani za použití 1 mM metforminu po 24 h (Obr. 20B). Zajímavé je, že po 18 h se již membránový potenciál nezměnil.

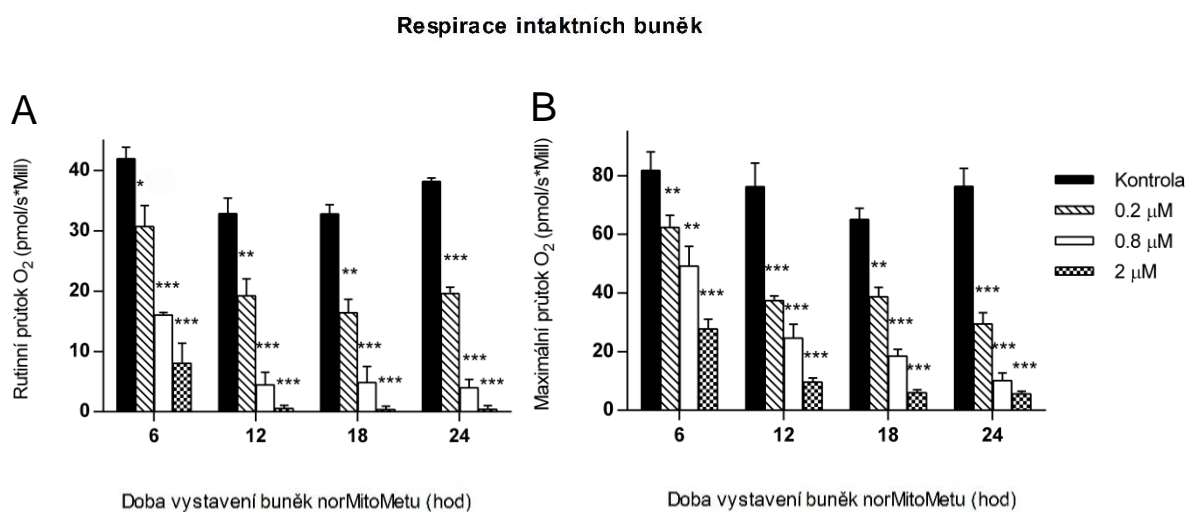


Obr. 20: Pokles mitochondriálního membránového potenciálu po prodlužující se době inkubace PANC-1 buněk s látkou norMitoMet (A). Porovnání $\Delta\Psi_m$ u buněk bez aplikované látky (kontrola) a po 24 h inkubaci buněk s 5 μM látkou norMitoMet a zvyšující se koncentrací metforminu (B).

5.4 Respirace intaktních buněk

Pro zjištění vlivu látky norMitoMet na mitochondriální funkci PANC-1 buněk jsme zvolili metodu respirometrie s vysokým rozlišením, která zaznamenáváním změn ve spotřebě kyslíku intaktních buněk poskytuje cenné informace například o rutinní respiraci nebo maximální kapacitě dýchacího řetězce.

Spotřebu kyslíku intaktními buňkami s exogenními substráty jsme měřili 6, 12, 18 a 24 h po aplikaci různých koncentrací látky norMitoMet. Po zahájení měření a přidání ADP i sukcinátu se respirace buněk výrazně neměnila - mitochondriální membrána tedy zůstala neporušená. Funkce respiračního řetězce byla viditelně pozměněna již po 6 h působení 0,2 μM látky norMitoMet. S prodlužující se dobou působení i zvyšující se koncentrací měl norMitoMet na respiraci prostřednictvím ETC významnější dopad. Již 2 μM koncentrace látky norMitoMet vedla k úplné inhibici rutinní respirace (Obr. 21A) po 12 h; stejná doba inkubace za použití koncentrace látky norMitoMet vyšší než 0,2 μM postačovala ke snížení kapacity respiračního řetězce přibližně o 50% (Obr. 21B).

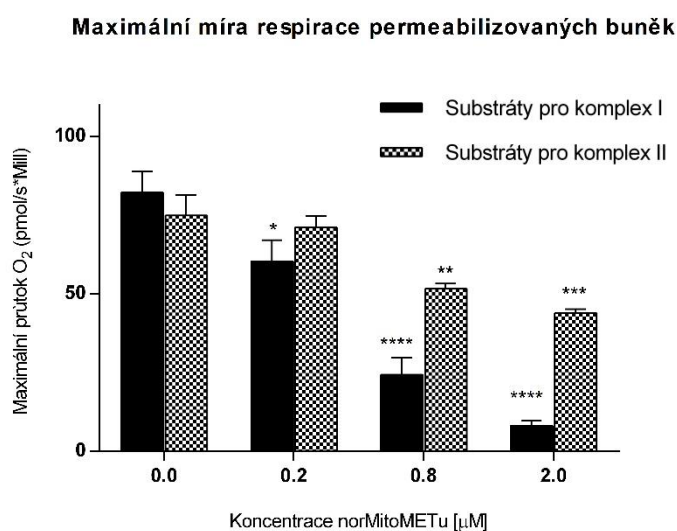


Obr. 21: Spotřeba kyslíku odrážející rutinní respiraci buněk (A) a maximální spotřeba kyslíku po použití protonoforu CCCP (B).

5.5 Respirace permeabilizovaných buněk

Narušením plazmatické membrány a dodáním substrátů specifických pro jednotlivé komplexy dýchacího řetězce lze pozorovat respiraci zprostředkovanou právě těmito komplexy a určit tak jejich aktivitu.

Jak je patrné z následujícího grafu (Obr. 22), po 24 h inkubace buněk s látkou norMitoMet byla významně snížena respirace stimulovaná glutamátem a malátem prostřednictvím komplexu I, zatímco na respiraci pomocí komplexu II měl norMitoMet mnohem menší vliv. Účinek látky norMitoMet je tedy specifický především pro komplex I.



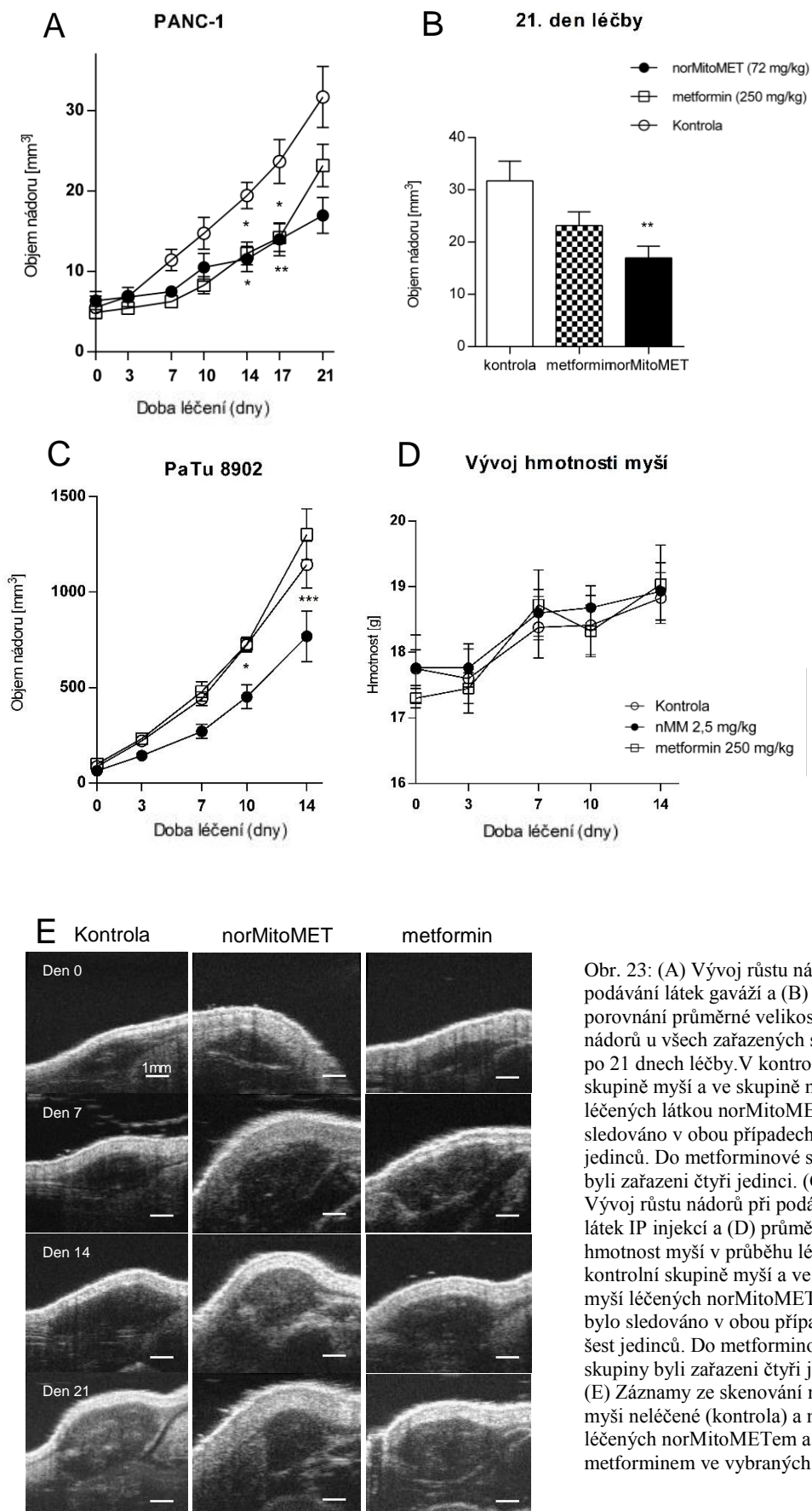
Obr. 22: Maximální spotřeba kyslíku buňkami po dodání substrátů specifických pro komplex I (glutamát a malát) a pro komplex II (sukcinát)

5.6 Sledování růstu nádorů pomocí experimentálního myšního modelu

Pro *in vivo* experimenty jsme zvolili imunosuprimované Balb/c *nu-nu* myši. Po aplikaci 2×10^6 PANC-1 buněk do podkoží jsme myši průběžně sledovali. Nádory se začaly tvořit po 2 – 4 týdnech od xenotransplantace. Léčba byla zahájena v době, kdy jsme již byli schopni nádory zaznamenat v podobě hmatatelného kožního hrbolku, tedy když nádory dosahovaly velikosti průměrně 6 mm^3 . Myši jsme rozdělili do tří skupin, kdy jedné skupině byl 3x týdně podáván gaváž norMitoMet ($125 \text{ } \mu\text{mol/kg}$), druhé metformin ($1,5 \text{ mmol/kg}$) a třetí skupinu tvořily kontrolní myši, kterým byl aplikován excipient (voda). Růst nádorů jsme sledovali a vyhodnocovali pomocí ultrazvukové zobrazovací metody.

NorMitoMet i metformin na základě výsledků zobrazených v Obr. 23E (s. 52) a shrnutých v grafu (Obr. 23A, s. 52) významně zpomalily po 14 dnech léčby růst nádorů odvozených od PANC-1 buněk ve srovnání s kontrolní skupinou myší. Po 21 dnech inhiboval norMitoMET růst nádorů zhruba o 40% jejich objemu u kontrolních myší, zatímco u metforminové skupiny tato tendence nebyla pozorována (Obr. 23B, s. 52). Během experimentu jsme se potýkali s časovou nesourodostí vzniku rakovinných novotvarů. U několika myší nevyvolaly injikované pankreatické buňky žádný detekovatelný nádor nebo byla jejich velikost takřka neměnná, a proto jsme je z experimentu vyřadili.

V současné době jsme zahájili další experimenty, pro které jsme vybrali pankreatickou linii PaTu 8902. Tuto linii jsme zvolili pro schopnost spolehlivěji vytvářet nádory; růst nádorů z xenotransplantovaných PaTu buněk je také rychlejší než v případě PANC-1 linie. Změnili jsme navíc dávky sloučeniny norMitoMet a způsob i frekvenci podávání látek na injekci do dutiny břišní 1x za den. Myši léčené látkou norMitoMet nevykazovaly stejně jako ostatní skupiny sledovaných myší výrazné hmotnostní výkyvy, a danou dávku tohoto mitokanu tak dobře snášely (Obr. 23D, s. 52). Průběžné výsledky (Obr. 23C, s. 52) ukazují signifikantně lepší schopnost l8tkz norMitoMet zpomalovat růst těchto nádorů ve srovnání s metforminem a neléčenými myšmi.



Obr. 23: (A) Vývoj růstu nádorů při podávání látek gaváží a (B) porovnání průměrné velikosti nádorů u všech zařazených skupin po 21 dnech léčby. V kontrolní skupině myši a ve skupině myši léčených látkou norMitoMET bylo sledováno v obou případech pět jedinců. Do metforminové skupiny byli zařazeni čtyři jedinci. (C) Vývoj růstu nádorů při podávání látek IP injekcí a (D) průměrná hmotnost myši v průběhu léčby. V kontrolní skupině myši a ve skupině myši léčených norMitoMETem bylo sledováno v obou případech šest jedinců. Do metforminové skupiny byli zařazeni čtyři jedinci. (E) Záznamy ze skenování nádorů myši neléčené (kontrola) a myši léčených norMitoMETem a metforminem ve vybraných dnech.

6 Diskuze

Nádory slinivky břišní patří mezi nejhůře léčitelná nádorová onemocnění a nové přístupy k jejich léčbě jsou proto nezbytné. Retrospektivní studie ukazují snížený výskyt rakoviny pankreatu u pacientů s DM2 léčených látkou ze skupiny biguanidů, metforminem (Gandini et al., 2014). Během posledních let bylo proto zahájeno několik klinických testů ověřujících účinek metforminu v kombinaci s chemoterapeutiky k léčbě metastazující rakoviny pankreatu (Chae et al., 2016). Dokončené 2. fáze tří z těchto studií však nepřinesly očekávané výsledky, neboť nezaznamenaly žádné signifikantní zlepšení průběhu onemocnění. Ačkoliv byl metformin pacienty velmi dobře přijímán a zmírňoval jejich reakce na chemoterapii, průměrná doba přežití v porovnání s kontrolní skupinou léčenou samotnými chemoterapeutiky se nelišila (Braghiroli et al., 2015; Kordes et al., 2015; Reni et al., 2015). Důvodem by mohla být metforminem řízená změna hladiny ROS, kterou některá chemoterapeutika zvyšují, a tudíž by mohlo docházet ke kontraindikaci. Zcela nezbytné je ale především vzít v potaz, jaká koncentrace metforminu je po aplikaci maximálních dávek 2000 mg/den, které se používají při léčbě DM2, v plazmě. Dle měření Kordes et al. a dalších výzkumných skupin se tato koncentrace pohybuje mezi 0,5 až 1 mg/l, zatímco *in vitro* výzkumy prokazují protirakovinný účinek metforminu až v řádech milimolárních koncentrací (Karnevi et al., 2013; Kordes et al., 2015; Liu a Coleman, 2009). Podávání tak vysokých dávek metforminu ovšem není u pacientů bezpečně dosažitelné, jelikož dávky vyšší než 2250 mg/den u diabetiků nezřídka vyvolávají vážné toxické následky (Boucaud-Maitre et al., 2016).

S uvážením prokázaných souvislostí mezi metforminem, diabetem a nádorovými onemocněními, a dále zásadní role mitochondrií v rozvoji zhoubných nádorů, jsme se proto rozhodli využít vlastností TPP⁺ a metforminu za účelem vytvoření nové mitochondriálně cílené látky norMitoMet. Tento projekt byl zaměřen na identifikaci mechanismů protinádorového působení obou sloučenin s důrazem na sledování jejich vlivu na mitochondriální funkci a molekulární mechanismus signalizačních drah vedoucí k apoptotické smrti, a to jak na buněčných liniích tak i pomocí experimentálních myších modelů nádorů slinivky břišní. Předpokládali jsme, že mitochondriálně cílený metformin se bude vyznačovat vyšší účinností v porovnání s jeho mateřskou látkou, a mohl by tak poskytnout příležitost pro zlepšení jinak velmi nepříznivých prognóz pacientů s rakovinou pankreatu.

K experimentům *in vitro* byla zvolena pankreatická rakovinná linie PANC-1 vyznačující se mutacemi v *KRAS* a *TP53* genech a homozygotní delecí genu *CDKN2A*. Schopnost metforminu

inhibovat proliferaci a iniciovat buněčnou smrt je pravděpodobně vyvolána interakcí s efekty K-Ras signalizace ovlivňující mimo jiné PI3K a ERK dráhy, jež je nadměrně aktivována nejen v případě buněčné linie PANC-1, ale především až v 95% všech případů PDAC (Guo et al., 2013; Jones et al., 2008). Cheng et al. a Guo et al. ve svých experimentech ukázali, že metformin navozuje *in vitro* cytostatické účinky pouze za použití nefyziologických koncentrací, alespoň 1 mM při době působení minimálně 48 h, a výhradně u nádorových buněk - vliv metforminu na přežívání nerakovinných epiteliálních buněk pankreatu nebyl pozorován (Cheng a Lanza-Jacoby, 2015; Guo et al., 2013). Dle očekávání skutečně dlouhodobé vystavení PANC-1 buněk nižším dávkám metforminu (<0,1 mM) k iniciaci apoptózy nevedlo. Naopak norMitoMet indukoval po 48 h buněčnou smrt již v koncentraci 1 μ M. Podíl apoptotických buněk se však pohyboval pouze kolem 20% a s prodloužením inkubační doby již nestoupal. Je tak možné, že norMitoMet spíše zastavuje buněčný cyklus, a pouze část buněk v důsledku toho přechází do apoptózy. Selektivita látky norMitoMet byla testována na nerakovinných BJ fibroblastech, u nichž ve srovnání s pankreatickými rakovinnými buňkami nebyla životaschopnost nikterak ovlivněna.

Metforminem vyvolaná inhibice růstu a stimulace apoptózy nádorových buněk je vysvětlována mimo jiné schopností snižovat hladinu ROS. V případě pankreatických rakovinných buněk byla zaznamenána v důsledku signalizace růstovými faktory zvýšená aktivita NAD(P)H oxidáz, které společně s komplexy dýchacího řetězce, z nichž komplex I je považován za hlavní cíl metforminu, řídí produkci ROS mitogenní signalizaci nezbytnou pro růst a proliferaci (Vaquero et al., 2004; Weinberg et al., 2010). Zatímco metformin však dle výsledků Chenga et al. významně omezoval tvorbu ROS po 48 h inkubaci, norMitoMet množství ROS naopak výrazně zvyšoval, a to již po 6 h působení 5 μ M koncentrace (Cheng a Lanza-Jacoby, 2015). Po 24 h dokonce stejná koncentrace látky norMitoMet způsobovala více než jednonásobný nárůst množství superoxidových radikálů v porovnání s kontrolními vzorky. Taková změna nepochybně vede k narušení oxidativní rovnováhy a metabolického obratu rakovinných buněk a s nimi spojené změně signalizace vedoucí k poškození DNA, proteinů a lipidů, popřípadě až k zastavení buněčného cyklu, vyvolání buněčné smrti, a tudíž celkově k potlačení tumorigeneze.

NorMitoMet tak zřejmě oproti metforminu pracuje v tomto ohledu odlišným způsobem, jenž spíše odpovídá působení látek rovněž modifikovaných TPP⁺ kationtem, které akumulací v mitochondriích oxidativní stres dále navyšují (Dong et al., 2011). Kromě přímého působení látky norMitoMet je dále známo, že exprese mitochondriální superoxid dismutázy je navíc

v mnohých pankreatických rakovinných liniích výrazně redukována, čímž je ještě oslabena antioxidační ochrana buněk (Cullen et al., 2003). Ani 1 mM metforminu navíc neměl po 24 h působení na hladinu ROS sebemenší vliv, a tak se mechanismus účinku látky norMitoMet ze skupiny mitokanů jeví jako výrazně efektivnější strategie.

Mitochondriální membránový potenciál je ukazatelem správné mitochondriální funkce a za normálních okolností je generován komplexy dýchacího řetězce. Při narušení ETC, kdy je tvorba elektrochemického gradientu nedostatečná, obrací ATP syntáza vlastní chod ve směru hydrolýzy ATP, a to právě za účelem udržení MMP. Reaktivní formy kyslíku, jejichž produkce je pak v důsledku reverzního elektronového toku zesílena, mohou peroxidací membránových lipidů zvyšovat propustnost mitochondriální membrány, která je asociována s depolarizací MMP a eventuálně i možnou apoptotickou smrtí (Barrientos a Moraes, 1999). Studovaná látka norMitoMet již po 6 h působení významně snižoval MMP, což zdánlivě odpovídá zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku. Míra depolarizace je ovšem velmi radikální, po 24 h působení 5 μ M sloučeniny norMitoMet byl MMP PANC-1 buněk snížen o více než 75% v porovnání s kontrolními vzorky, a tak je nutné připustit roli látky norMitoMet také jako rozpráhovače MMP nebo látky interagující s dalšími mitochondriálními strukturami, než výlučně komplexem I respiračního řetězce. Pravděpodobně lze tento výsledek působení přičítat nadměrnému hromadění mitokanu norMitoMet v mitochondriích vlivem TPP^+ kationtu, který může zesílit mitochondriální akumulaci bioaktivních molekul i více než stonásobně (Smith et al., 2003). Depolarizace MMP může být také asociována se zvýšenou produkcí ROS, přičemž oba děje jsou prvními kroky permeabilizace mitochondriální membrány a navazující buněčnou smrt.

Za účelem hlubšího poznání účinků látky norMitoMet na mitochondriální metabolismus a buněčnou bioenergetiku byla hodnocena buněčná respirace intaktních pankreatických rakovinných buněk ovlivněných právě tímto mitokanem metodou respirometrie s vysokým rozlišením, kterou lze predikovat možný výskyt mitochondriální dysfunkce. S prodlužující se inkubační dobou a zvyšující se koncentrací látky norMitoMet byla patrná výrazná inhibice jak bazální respirace, tak i celkové kapacity dýchacího řetězce. V případě bazální respirace lze pokles ve spotřebě kyslíku vysvětlit právě defektní funkcí mitochondrií, jejímž vlivem může dojít k oslabení syntézy ATP způsobující prostřednictvím AMPK přepnutí metabolických drah ve směru rozkladných buněčných reakcí, jež nádorové bujení zpomalují. Tomu odpovídá také obecně přijímané protinádorové působení metforminu. Snížená kapacita ETC pak hypotézu pravděpodobného mitochondriálního poškození dále podporuje, zejména komplexů dýchacího

řetězce vzhledem k použití inhibitoru ATP syntázy a protonoforu, díky kterým není aktivita komplexů ETC téměř limitována a je tak stimulována k maximální možné aktivitě.

Poměrně překvapivě docházelo k signifikantní inhibici respirace již po 6 h působení 2 μ M norMitoMetu, zatímco výraznější změna hladiny ROS a depolarizace MMP nastávala spíše se zpožděním, po 12 h. Je proto možné, že se nádorové buňky po určitou dobu dokáží s těmito podmínkami vyrovnat buď využíváním syntézy ATP v glykolytickém cyklu nebo reverzním elektronovým tokem, jenž by mohl udržovat MMP ale zároveň zvyšovat množství produkovaných ROS, a tudíž až po překonání jisté hranice oxidativního stresu a vyčerpání energetických zásob by mohla být spuštěna adekvátní buněčná odpověď.

Ačkoliv v rámci této práce nebyl testován vliv látky norMitoMet na schopnost PANC-1 buněk vytvářet sféry, které jsou ukazatelem aktivity nádorových kmenových buněk, vzhledem k výraznému potlačení respirace se můžeme domnívat, že norMitoMet by mohl být velmi účinným nástrojem pro eliminaci právě této buněčné populace. Tuto domněnku dokládají například studie snížené životaschopnosti TICs glioblastomu indukované metforminem a rovněž i větší efektivita mitokanu MitoVES v zabíjení buněčných sfér oproti mateřské látce α -TOS bez kovalentně vázaného TPP⁺ (Würth et al., 2013; Yan et al., 2015). Pro udržení funkce rakovinných kmenových buněk se tak mitochondrie zdají jako nepostradatelné a vhodné pro cílení nových terapeutických látek, což nedávno potvrdily i dvě nezávislé studie (Sancho et al., 2015; Viale et al., 2014). Sancho et al. ovšem navíc odhalili, že malá subpopulace pankreatických TICs si vytvořila na metformin rezistenci a dále vykazovala i sníženou kmenovost a mitochondriální aktivitu, což by teoreticky mohla být příčina nedostatečné odpovědi pacientů na léčbu tímto biguanidem v klinických testech. V případě jiné mitochondriálně cílené látky menadionu, jejíž hlavní účinek spočívá v nadměrné produkci ROS, kterou jsme registrovali taktéž u námi syntetizované látky norMitoMet, však tato populace buněk detekována nebyla a další studie chování TICs jsou proto nutné (Sancho et al., 2015).

Již výše zmiňovaná snížená kapacita ETC jasně naznačovala pravděpodobnou přímou interakci látky norMitoMet s některým z komplexů dýchacího řetězce. Vzhledem k předpokládanému místu působení metforminu na NADH dehydrogenázu jsme tak i v případě jeho mitochondriálně cíleného analogu očekávali inhibiční účinek v první řadě na tento proteinový komplex. Pro ověření hypotézy byla sledována spotřeba kyslíku permeabilizovanými buňkami za dodání substrátů specifických pro komplex I či II, čímž bylo možné určit jejich relativní

příspěvek k mitochondriální respiraci. Látka norMitoMet téměř zcela potlačila spotřebu kyslíku PANC-1 buňkami respirujícími pomocí substrátů komplexu I a významně omezila i jeho celkovou kapacitu. Zároveň byl však zřejmý určitý vliv studovaného mitokanu také na komplex II. Výsledky zdánlivě odpovídají nedávno publikované práci zabývající se působením biguanidů na mitochondrie krysích jaterních buněk, jež připouští vysokou účinnost těchto sloučenin, zato nižší specifitu, jelikož byla pozorována interakce metforminu nejen s komplexem I, ale také II a IV (Drahota et al., 2014). Současně je třeba s ohledem k uvedeným datům zvážit i potenciální schopnost látky norMitoMet ovlivnit stavbu mitochondriálních superkomplexů, ať už přímou interakcí nebo nepřímo, jako následek možných katabolických reakcí, které mohou vést k hladovění rakovinných buněk, jež metformin bezpochyby navozuje a jež by mohly vyústit právě v rozpad superkomplexů. Některé výzkumné skupiny zaznamenaly v důsledku rozpadu superkomplexů významný nárůst hladiny ROS a destabilizaci komplexu I, a tak nelze takovýto způsob účinku látky norMitoMet skutečně vyloučit (Acin-Perez, 2014; Genova a Lenaz, 2014).

Vzhledem k velmi dobře tolerovanému orálnímu způsobu podávání metforminu pacientům s DM2 jsme nejprve pro sledování schopnosti této látky i jejího mitochondriálně cíleného analogu potlačovat růst nádorů *in vivo* zvolili aplikaci gaváže. Metformin se překvapivě zdál méně účinný než pozorovali Kisfalvi et al. při orálním podávání srovnatelné koncentrace tohoto biguanidu myším v pitné vodě (Kisfalvi et al., 2013). Důvodem nesrovnalosti by mohlo být dosažení nižší hladiny metforminu v plazmě vlivem odlišné frekvence podávání, jejíž důležitost zdůrazňuje například práce Dowlinga et al. Tato výzkumná skupina odhalila, že při nepřetržitém vystavení metforminu myším v pitné vodě byly nádorové buňky schopné vstřebávat obdobné množství této látky, jako bylo detekováno v plazmě, a naproti tomu při intraperitoneálním podání byla účinnost vstřebávání nižší (Dowling et al., 2016). NorMitoMet inhiboval růst nádorů v porovnání s metforminem mnohem účinněji a zároveň i v nižších dávkách. Za použití intraperitoneální injekce, kdy myším byla podávána maximální tolerovaná dávka, byl navíc tento rozdíl ještě větší. Možným vysvětlením by mohl být kromě odlišné akumulace v mitochondriích také jiný způsob vstupu obou látek do buněk, jelikož zatímco metformin tak činí prostřednictvím membránových přenašečů, norMitoMet patrně prostupuje přímo plazmatickou membránou díky kovalentní vazbě TPP⁺ kationtu, velmi negativnímu MMP rakovinných buněk a souvisejícímu silnému elektrochemickému gradientu.

7 Závěr

- norMitoMet působil ve všech provedených experimentech s vyšší účinností než metformin, a to o 3 až 4 řády;
- Inkubace s látkou norMitoMet po dobu 48 h vedla k signifikantnímu nárůstu míry buněčné smrti u pankreatických rakovinných buněk v kultuře;
- norMitoMet selektivně zabíjel pouze pankreatické rakovinné PANC-1 buňky ve srovnání s nerakovinnými BJ fibroblasty;
- Inkubace s látkou norMitoMet zapříčinila *in vitro* zvýšenou produkci kyslíkových radikálů a snížení mitochondriálního membránového potenciálu;
- norMitoMet inhiboval ve 2 μ M koncentraci rutinní respiraci pankreatických rakovinných buněk a snižoval celkovou kapacitu dýchacího řetězce;
- Podobně jako metformin, norMitoMet specificky oslaboval buněčnou respiraci zprostředkovanou komplexem I;
- norMitoMet potlačoval růst xenotransplantovaných nádorů imunodeficientních myší ve výrazně nižších dávkách v porovnání s metforminem.

V souladu s výsledky prezentovanými v této práci, které potvrzují naši hypotézu, je zřejmě vyšší účinnost látky norMitoMet způsobena především její intenzivnější akumulací v mitochondriích pankreatických rakovinných buněk díky asociaci s fosfoniovým kationtem. Cílení do mitochondrií se tak ukázalo jako slibná terapeutická strategie k efektivní léčbě maligních onemocnění prostřednictvím regulace hladiny ROS či ovlivněním metabolických adaptací a asociovaných signalizací nádorových buněk s potenciálním využitím také k eliminaci chemorezistentních rakovinných subpopulací. Poměrně výrazná hydrofilní povaha látky norMitoMet ovšem patrně zpomaluje jeho schopnost prostupovat plazmatickou membránou; z tohoto důvodu se buněčná odpověď mohla projevovat až se zpožděním. Vazba například lipofilní skupiny nebo jiného přenašeče na molekulu tohoto mitokanu by tak mohla jeho účinek ještě zesílit.

8 Seznam použité literatury

- Acin-Perez, R., Enriquez, J. A. (2014). The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model. *Biochim Biophys Acta*, 1837, 444-450.
- Aggarwal, G., Kamada, P. a Chari, S. T. (2013). Prevalence of diabetes mellitus in pancreatic cancer compared to common cancers. *Pancreas*, 42, 198-201.
- Algire, C., Moiseeva, O., Deschenes-Simard, X., Amrein, L., Petrucci, L., Birman, E., et al. (2012). Metformin reduces endogenous reactive oxygen species and associated DNA damage. *Cancer Prev Res (Phila)*, 5, 536-43.
- Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N. a Perucho, M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*, 53, 549-54.
- Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U.C.M., Podowski, R.M., Näslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H. And Kurland, C.G. (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*, 396, 133-140.
- Ansari, D., Rosendahl, A., Elebro, J. a Andersson, R. (2011). Systematic review of immunohistochemical biomarkers to identify prognostic subgroups of patients with pancreatic cancer. *British Journal of Surgery*, 98, 1041-1055.
- Bailey, C. J. a Day, C. (2004). Metformin: its botanical background. *Practical Diabetes International*, 21, 115-117.
- Baker, L. A., Watt, I. N., Runswick, M. J., Walker, J. E., & Rubinstein, J. L. (2012). Arrangement of subunits in intact mammalian mitochondrial ATP synthase determined by cryo-EM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 11675-11680.
- Bao, Y., Giovannucci, E. L., Kraft, P., Stampfer, M. J., Ogino, S., Ma, J., et al. (2013). A prospective study of plasma adiponectin and pancreatic cancer risk in five US cohorts. *Journal of the National Cancer Institute*, 105, 95-103.
- Baradaran, R., Berrisford, J. M., Minhas, G. S. a Sazanov, L. A. (2013). Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature*, 494, 443-8.
- Bardeesy, N., Cheng, K. H., Berger, J. H., Chu, G. C., Pahler, J., Olson, P., et al. (2006). Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev*, 20, 3130-46.
- Barrientos, A. a Moraes, C. T. (1999). Titrating the Effects of Mitochondrial Complex I Impairment in the Cell Physiology. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 16188-16197.
- Baysal, B. E., Ferrell, R.E., Willett-Brozick, J.E., Lawrence, E.C., Myssiorek, D., Bosch, A., Van Der Mey, A., Taschner, P.E., Rubinstein, W.S., Myers, E.N. And Richard, C.W. (2000). Mutations in SDHD, a Mitochondrial Complex II Gene, in Hereditary Paraganglioma. *Science*, 287, 848-851.
- Behrend, L., Henderson, G. a Zwacka, R. M. (2003). Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Molecular Mechanisms of Signalling*, 31, 1441-1444.
- Beinert, H., Holm, R.H. And Münck, E. (1997). Iron-sulfur clusters: Nature's Modular, Multipurpose Structures. *Science*, 277, 653-659.
- Ben, Q., Xu, M., Ning, X., Liu, J., Hong, S., Huang, W., et al. (2011). Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: a meta-analysis of cohort studies. *European Journal of Cancer*, 47, 1928-1937.
- Bereiter-Hahn, J. a Voth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech*, 27, 198-219.
- Bianchi, C., Genova, M. L., Parenti Castelli, G. a Lenaz, G. (2004). The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J Biol Chem*, 279, 36562-9.

- Blandino, G., Valerio, M., Cioce, M., Mori, F., Casadei, L., Pulito, C., et al. (2012). Metformin elicits anticancer effects through the sequential modulation of DICER and c-MYC. *Nat Commun*, 3, 865-876.
- Bonnet, D. a Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 3, 730-7.
- Boucaud-Maitre, D., Ropers, J., Porokhov, B., Altman, J. J., Bouhanick, B., Doucet, J., et al. (2016). Lactic acidosis: relationship between metformin levels, lactate concentration and mortality. *Diabetic Medicine*.
- Boyer, P. D. (1989). A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis. *The FASEB Journal*, 3, 2164-2176.
- Braghiroli, M. I., De Celis Ferrari, A. C., Pfiffer, T. E., Alex, A. K., Nebuloni, D., Carneiro, A. S., et al. (2015). Phase II trial of metformin and paclitaxel for patients with gemcitabine-refractory advanced adenocarcinoma of the pancreas. *Ecancermedicalscience*, 9, 563.
- Braun, H. P. S., U. K. (1995). Are the 'core' proteins of the mitochondrial bc1 complex evolutionary relics of a processing protease? *Trends Biochem Sci*, 20, 171-175.
- Burris, H. a Storniolo, A. (1997). Assessing clinical benefit in the treatment of pancreas cancer: gemcitabine compared to 5-fluorouracil. *European Journal of Cancer*, 33, 18-22.
- Calderwood, S. K. a Ciocca, D. R. (2008). Heat shock proteins: stress proteins with Janus-like properties in cancer. *Int J Hyperthermia*, 24, 31-9.
- Cantoria, M. J., Boros, L. G. a Meuillet, E. J. (2014). Contextual inhibition of fatty acid synthesis by metformin involves glucose-derived acetyl-CoA and cholesterol in pancreatic tumor cells. *Metabolomics*, 10, 91-104.
- Cogliati, S., Enriquez, J. A. a Scorrano, L. (2016). Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends Biochem Sci*, 41, 261-73.
- Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M. E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., et al. (2013). Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell*, 155, 160-71.
- Colombini, M. (1980). Structure and mode of action of a voltage dependent anion-selective channel (VDAC) located in the outer mitochondrial membrane. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 341, 552-564.
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., Becouarn, Y., et al. (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*, 364, 1817-25.
- Corominas-Faja, B., Quirantes-Pine, R., Oliveras-Ferraros, C., Vazquez-Martin, A., Cufi, S., Martin-Castillo, B., et al. (2012). Metabolomic fingerprint reveals that metformin impairs one-carbon metabolism in a manner similar to the antifolate class of chemotherapy drugs. *Aging (Albany NY)*, 4, 480-98.
- Cullen, J. J., Weydert, C., Hinkhouse, M. M., Ritchie, J., Domann, F. E., Spitz, D., et al. (2003). The role of manganese superoxide dismutase in the growth of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*, 63, 1297-303.
- Dasu, M. R., Devaraj, S., Zhao, L., Hwang, D. H. a Jialal, I. (2008). High Glucose Induces Toll-Like Receptor Expression in Human Monocytes: Mechanism of Activation. *Diabetes*, 57, 3090-3098.
- Ding, X. Z., Fehsenfeld, D. M., Murphy, L. O., Permert, J. a Adrian, T. E. (2000). Physiological concentrations of insulin augment pancreatic cancer cell proliferation and glucose utilization by activating MAP kinase, PI3 kinase and enhancing GLUT-1 expression. *Pancreas*, 21, 310-20.
- Dong, L. F., Jameson, V. J., Tilly, D., Cerny, J., Mahdavian, E., Marin-Hernandez, A., et al. (2011). Mitochondrial targeting of vitamin E succinate enhances its pro-apoptotic and anti-cancer activity via mitochondrial complex II. *J Biol Chem*, 286, 3717-28.
- Dowling, R. J., Lam, S., Bassi, C., Mouaaz, S., Aman, A., Kiyota, T., et al. (2016). Metformin Pharmacokinetics in Mouse Tumors: Implications for Human Therapy. *Cell Metab*, 23, 567-8.

- Drahota, Z., Palenickova, E., Endlicher, R., Milerova, M., Brejchova, J., Vosahlikova, M., et al. (2014). Biguanides inhibit complex I, II and IV of rat liver mitochondria and modify their functional properties. *Physiol Res*, 63, 1-11.
- Draznin, B. (2011). Mechanism of the mitogenic influence of hyperinsulinemia. *Diabetol Metab Syndr*, 3, 10-13.
- El-Mir, M. Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Avéret, N., Rigoulet, M. And Leverve, X. (2000). Dimethylbiguanide Inhibits Cell Respiration via an Indirect Effect Targeted on the Respiratory Chain Complex I. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 223-228.
- Enriquez, J. A. (2016). Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annu Rev Physiol*, 78, 533-61.
- Ernster, L. a Schatz, G. (1981). Mitochondria: A Historical Review. *The Journal of cell biology*, 91, 227-255.
- Eser, S., Schnieke, A., Schneider, G. a Saur, D. (2014). Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 111, 817-822.
- Fantin, V. R., St-Pierre, J. a Leder, P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*, 9, 425-34.
- Faubert, B., Boily, G., Izreig, S., Griss, T., Samborska, B., Dong, Z., et al. (2013). AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell Metab*, 17, 113-24.
- Feng, Y., Ke, C., Tang, Q., Dong, H., Zheng, X., Lin, W., et al. (2014). Metformin promotes autophagy and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma by downregulating Stat3 signaling. *Cell Death & Disease*, 5, e1088.
- Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., Gottfried, E., Schwarz, S., Rothe, G., Hoves, S. And Renner, K. (2007). Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*, 9, 3812-3819.
- Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Vitale, I., Rigoni, A., Vacchelli, E., et al. (2010). Mitochondrial gateways to cancer. *Mol Aspects Med*, 31, 1-20.
- Gandhi, L., Camidge, D. R., Ribeiro De Oliveira, M., Bonomi, P., Gandara, D., Khaira, D., et al. (2011). Phase I study of Navitoclax (ABT-263), a novel Bcl-2 family inhibitor, in patients with small-cell lung cancer and other solid tumors. *J Clin Oncol*, 29, 909-16.
- Gandini, S., Puntoni, M., Heckman-Stoddard, B. M., Dunn, B. K., Ford, L., Decensi, A., et al. (2014). Metformin and cancer risk and mortality: a systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders. *Cancer Prev Res (Phila)*, 7, 867-85.
- Genkinger, J. M., Spiegelman, D., Anderson, K. E., Bernstein, L., Van Den Brandt, P. A., Calle, E. E., et al. (2011). A pooled analysis of 14 cohort studies of anthropometric factors and pancreatic cancer risk. *International journal of cancer*, 129, 1708-1717.
- Genova, M. L. a Lenaz, G. (2014). Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochim Biophys Acta*, 1837, 427-43.
- Gnaiger, E. (2008). Polarographic oxygen sensors, the oxygraph, and high-resolution respirometry to assess mitochondrial function.
- Guertin, D. A. a Sabatini, D. M. (2007). Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*, 12, 9-22.
- Guillaumond, F., Leca, J., Olivares, O., Lavaut, M. N., Vidal, N., Berthezene, P., et al. (2013). Strengthened glycolysis under hypoxia supports tumor symbiosis and hexosamine biosynthesis in pancreatic adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 3919-24.
- Guo, X.-Z., Cui, Z.-M. a Liu, X. (2013). Current developments, problems and solutions in the non-surgical treatment of pancreatic cancer. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 5, 20-28.
- Halliwell, B. a Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*, 142, 231-55.

- Hamanaka, R. B. a. C., N.S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in biochemical sciences*, 35, 505-513.
- Hamilton, S. R., Aaltonen, L. A., Cancer, I. a. F. R. O. a Organization, W. H. 2000. *Pathology and genetics of tumours of the digestive system*, Lyon: IARC press.
- Hanahan, D. a Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- Heinemann, V., Boeck, S., Hinke, A., Labianca, R. a Louvet, C. (2008). Meta-analysis of randomized trials: evaluation of benefit from gemcitabine-based combination chemotherapy applied in advanced pancreatic cancer. *BMC Cancer*, 8, 1-11.
- Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J. W., Guba, M., et al. (2007). Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. *Cell Stem Cell*, 1, 313-323.
- Hruban, R., Wilentz, R., Goggins, M., Offerhaus, G., Yeo, C. a Kern, S. (1999). Pathology of incipient pancreatic cancer. *Annals of oncology*, 10, S9-S11.
- Hughes, G., Murphy, M.P. And Ledgerwood, E.C. (2005). Mitochondrial reactive oxygen species regulate the temporal activation of nuclear factor κ B to modulate tumour necrosis factor-induced apoptosis: evidence from mitochondria-targeted antioxidants. *Biochemical Journal*, 389, 83-89.
- Huxley, R., Ansary-Moghaddam, A., De González, A. B., Barzi, F. a Woodward, M. (2005). Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *British journal of cancer*, 92, 2076-2083.
- Chae, Y. K., Arya, A., Malecek, M. K., Shin, D. S., Carneiro, B., Chandra, S., et al. (2016). Repurposing metformin for cancer treatment: current clinical studies. *Oncotarget*.
- Chance, B., Williams, G.R., Holmes, W.F. And Higgins, J. (1955). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation V. A mechanism for oxidative phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 13.
- Chen, Y.- R. a Zweiter, L. (2014). Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circulation research*, 114, 524-37.
- Cheng, G. a Lanza-Jacoby, S. (2015). Metformin decreases growth of pancreatic cancer cells by decreasing reactive oxygen species: Role of NOX4. *Biochem Biophys Res Commun*, 465, 41-6.
- Iodice, S., Gandini, S., Maisonneuve, P. a Lowenfels, A. B. (2008). Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 393, 535-545.
- Iverson, T. M. (2013). Catalytic mechanisms of complex II enzymes: a structural perspective. *Biochim Biophys Acta*, 1827, 648-57.
- Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., et al. (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science*, 281, 64-71.
- Izumi, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Uramoto, H., Yoshida, Y., Tanabe, M., et al. (2003). Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treatment Reviews*, 29, 541-549.
- Jeong, E. G., Lee, J.W., Soung, Y.H., Nam, S.W., Kim, S.H., Lee, J.Y., Yoo, N.J. And Lee, S.H. (2006). Immunohistochemical and mutational analysis of apoptosis-inducing factor (AIF) in colorectal carcinomas. *Apmis*, 114, 867-873.
- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., et al. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*, 321, 1801-6.
- Kalender, A., Selvaraj, A., Kim, S. Y., Gulati, P., Brule, S., Viollet, B., et al. (2010). Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab*, 11, 390-401.
- Karnevi, E., Said, K., Andersson, R. a Rosendahl, A. H. (2013). Metformin-mediated growth inhibition involves suppression of the IGF-I receptor signalling pathway in human pancreatic cancer cells. *BMC Cancer*, 13, 11.

- Kim, J. W., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L. a Dang, C. V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*, 3, 177-85.
- Kisfalvi, K., Moro, A., Sinnett-Smith, J., Eibl, G. a Rozengurt, E. (2013). Metformin Inhibits the Growth of Human Pancreatic Cancer Xenografts. *Pancreas*, 42, 781-785.
- Ko, Y. H., Smith, B. L., Wang, Y., Pomper, M. G., Rini, D. A., Torbenson, M. S., et al. (2004). Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324, 269-275.
- Kong, Q., Beel, J. A. a Lillehei, K. O. (2000). A threshold concept for cancer therapy. *Med Hypotheses*, 55, 29-35.
- Kordes, S., Pollak, M. N., Zwinderman, A. H., Mathôt, R. A., Weterman, M. J., Beeker, A., et al. (2015). Metformin in patients with advanced pancreatic cancer: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 16, 839-847.
- Kourie, H. R., Gharios, J., Elkarak, F., Antoun, J. a Ghosn, M. (2016). Is metastatic pancreatic cancer an untargetable malignancy? *World J Gastrointest Oncol*, 8, 297-304.
- Kroemer, G. a Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*, 13, 472-82.
- Lamb, R., Lisanti, M. P., Clarke, R. B. a Landberg, G. (2014). Co-ordination of cell cycle, migration and stem cell-like activity in breast cancer. *Oncotarget*, 5, 7833-7842.
- Lever, J. D. a C., J.B. (1958). Mitochondria Isolated from Rat Brown Adipose Tissue and Liver. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 4, 287-290.
- Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., et al. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, 67, 1030-7.
- Liang, J., Shao, S. H., Xu, Z. X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., et al. (2007). The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol*, 9, 218-24.
- Liu, A. a Coleman, S. P. (2009). Determination of metformin in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877, 3695-3700.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R. And Wang, X. (1996). Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c. *Cell*, 86, 147-157.
- Lonardo, E., Cioffi, M., Sancho, P., Sanchez-Ripoll, Y., Trabulo, S. M., Dorado, J., et al. (2013). Metformin targets the metabolic achilles heel of human pancreatic cancer stem cells. *PLoS One*, 8, e76518.
- Ma, J., Siegel, R. a Jemal, A. (2013). Pancreatic cancer death rates by race among US men and women, 1970-2009. *J Natl Cancer Inst*, 105, 1694-700.
- Mannella, C. A. (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta*, 1763, 542-8.
- Massard, C., Zermati, Y., Pauleau, A. L., Larochette, N., Metivier, D., Sabatier, L., et al. (2006). hTERT: a novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene*, 25, 4505-14.
- Mathupala, S. P., Ko, Y. H. a Pedersen, P. L. (2006). Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene*, 25, 4777-86.
- Matoba, S., Kang, J.G., Patino, W.D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P.J., Bunz, F. And Hwang, P.M. (2006). p53 regulates mitochondrial respiration. *Science*, 312, 1650-1654.
- Mileykovskaya, E. a D., W. (2009). Cardiolipin membrane domains in prokaryotes and eukaryotes. *Biochim Biophys Acta*, 1788, 2084-2091.
- Miller, R. J. (1998). Mitochondria – the kraken wakes! *Trends in Neurosciences*, 21, 95-98.

- Mitchell, P. (2011). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. 1966. *Biochim Biophys Acta*, 1807, 1507-38.
- Mohammed, A., Janakiram, N. B., Brewer, M., Ritchie, R. L., Marya, A., Lightfoot, S., et al. (2013). Antidiabetic Drug Metformin Prevents Progression of Pancreatic Cancer by Targeting in Part Cancer Stem Cells and mTOR Signaling. *Transl Oncol*, 6, 649-59.
- Moiseeva, O., Deschênes-Simard, X., St-Germain, E., Igelmann, S., Huot, G., Cadar, A. E., et al. (2013). Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- κ B activation. *Aging Cell*, 12, 489-498.
- Moparthi, V. K., Kumar, B., Al-Eryani, Y., Sperling, E., Górecki, K., Drakenberg, T. And Hägerhäll, C. (2014). Functional role of the MrpA- and MrpD-homologous protein subunits in enzyme complexes evolutionary related to respiratory chain complex. *Biochim Biophys Acta*, 1837, 178-185.
- Moreira, P. I., Custódio, J., Moreno, A., Oliveira, C. R. a Santos, M. S. (2006). Tamoxifen and Estradiol Interact with the Flavin Mononucleotide Site of Complex I Leading to Mitochondrial Failure. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 10143-10152.
- Mulkidjanian, A. Y. (2005). Ubiquinol oxidation in the cytochrome bc₁ complex: Reaction mechanism and prevention of short-circuiting. *Biochim Biophys Acta*, 1709, 5-34.
- Murphy, M. P. (1997). Selective targeting of bioactive compounds to mitochondria. *Trends Biotechnol*, 15, 326-30.
- Neupert, W. a Herrmann, J. M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 76, 723-49.
- Neužil, J., Weber, T., Schroder, A., Lu, M., Ostermann, G., Gellert, N., et al. (2001). Induction of cancer cell apoptosis by alpha-tocopheryl succinate: molecular pathways and structural requirements. *FASEB J*, 15, 403-15.
- Neužil, J., Dong, L. F., Rohlena, J., Truksa, J. a Ralph, S. J. (2013). Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. *Mitochondrion*, 13, 199-208.
- Noji, H. Y., R.; Yoshida, M.; Kinosita, K. Jr. (1997). Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. *Nature*, 386, 299-303.
- Nunnari, J. a Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, 148, 1145-59.
- Oliveira-Cunha, M., Newman, W. G. a Siriwardena, A. K. (2011). Epidermal Growth Factor Receptor in Pancreatic Cancer. *Cancers*, 3, 1513-1526.
- Owen, M. R., Doran, E. a Halestrap, A. P. (2000). Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J*, 348 Pt 3, 607-14.
- Pavlidis, S., Tsirigos, A., Migneco, G., Whitaker-Menezes, D., Chiavarina, B., Flomenberg, N., et al. (2010). The autophagic tumor stroma model of cancer: Role of oxidative stress and ketone production in fueling tumor cell metabolism. *Cell Cycle*, 9, 3485-505.
- Penchev, V. R., Rasheed, Z. A., Maitra, A. a Matsui, W. (2012). Heterogeneity and targeting of pancreatic cancer stem cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18, 4277-4284.
- Polster, B. M., Nicholls, D. G., Ge, S. X. a Roelofs, B. A. (2014). Use of potentiometric fluorophores in the measurement of mitochondrial reactive oxygen species. *Methods Enzymol*, 547, 225-50.
- Porteous, C. M., Logan, A., Evans, C., Ledgerwood, E. C., Menon, D. K., Aigbirhio, F., et al. (2010). Rapid uptake of lipophilic triphenylphosphonium cations by mitochondria in vivo following intravenous injection: implications for mitochondria-specific therapies and probes. *Biochim Biophys Acta*, 1800, 1009-17.
- Pouyssegur, J., Dayan, F. a Mazure, N. M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*, 441, 437-43.

- Powell, D. R., Suwanichkul, A., Cubbage, M. L., Depaolis, L. A., Snuggs, M. B. a Lee, P. D. (1991). Insulin inhibits transcription of the human gene for insulin-like growth factor-binding protein-1. *J Biol Chem*, 266, 18868-76.
- Pryor, R., a Cabreiro, F. (2015). Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. *Biochemical Journal*, 471, 307-322.
- Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M. a Matrisian, L. M. (2014). Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res*, 74, 2913-21.
- Ralph, S. J. (2009). Mitochondria as targets for cancer therapy. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, 9-28.
- Ralph, S. J., Low, P., Dong, L., Lawen, A. a Neuzil, J. (2006). Mitocans: mitochondrial targeted anti-cancer drugs as improved therapies and related patent documents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 1, 327-46.
- Reni, M., Dugnani, E., Cereda, S., Belli, C., Balzano, G., Nicoletti, R., et al. (2015). (Ir)relevance of metformin treatment in patients with metastatic pancreatic cancer: an open-label, randomized phase 2 trial. *Clin Cancer Res*.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. a Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414, 105-11.
- Ria, F., Landriscina, M., Remiddi, F., Rosselli, R., Iacoangeli, M., Scerrati, M., Pani, G., Borrello, S. And Galeotti, T. (2001). The level of manganese superoxide dismutase content is an independent prognostic factor for glioblastoma. Biological mechanisms and clinical implications. *British Journal of Cancer*, 84.
- Rohlena, J., Dong, L. F. a Neuzil, J. (2012). Targeting the mitochondrial electron transport chain complexes for the induction of apoptosis and cancer treatment. *Curr Pharm Biotechnol* 14, 377-389.
- Saif, M. W. (2007). Controversies in the adjuvant treatment of pancreatic adenocarcinoma. *Jop*, 8, 545-52.
- Sancho, P., Burgos-Ramos, E., Tavera, A., Bou Kheir, T., Jagust, P., Schoenhals, M., et al. (2015). MYC/PGC-1alpha Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cell Metab*, 22, 590-605.
- Sazanov, L. A. (2015). A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. *Nature reviews Molecular cell biology*, 16, 375-388.
- Shackelford, D. B. a Shaw, R. J. (2009). The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*, 9, 563-75.
- Shagger, H. P., K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO*, 19, 1777-1785.
- Shen, H., Zhan, M., Wang, W., Yang, D. a Wang, J. (2016). Impact of diabetes mellitus on the survival of pancreatic cancer: a meta-analysis. *Onco Targets Ther*, 9, 1679-88.
- Sheu, S.-S., Nauduri, D. a Anders, M. W. (2006). Targeting antioxidants to mitochondria: A new therapeutic direction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1762, 256-265.
- Shinzawa-Itoh, K., Aoyama, H., Muramoto, K., Terada, H., Kurauchi, T., Tadehara, Y., Yoshikawa, S. (2007). Structures and physiological roles of 13 integral lipids of bovine heart cytochrome c oxidase. *EMBO*, 26, 1713-1725.
- Schneider, M. B., Matsuzaki, H., Haorah, J., Ulrich, A., Standop, J., Ding, X. Z., et al. (2001). Prevention of pancreatic cancer induction in hamsters by metformin. *Gastroenterology*, 120, 1263-70.
- Schönleben, F., Qiu, W., Bruckman, K. C., Ciau, N. T., Li, X., Lauerman, M. H., et al. (2007). BRAF and KRAS gene mutations in intraductal papillary mucinous neoplasm/carcinoma (IPMN/IPMC) of the pancreas. *Cancer letters*, 249, 242-248.
- Schrepfer, E. a Scorrano, L. (2016). Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism. *Mol Cell*, 61, 683-94.

- Schutte, M., Hruban, R. H., Geradts, J., Maynard, R., Hilgers, W., Rabindran, S. K., et al. (1997). Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res*, 57, 3126-30.
- Siegel, R. L., Miller, K. D. a Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66, 7-30.
- Slater, E. P., Fendrich, V., Strauch, K., Rospleszcz, S., Ramaswamy, A., Mätthai, E., et al. (2013). LCN2 and TIMP1 as Potential Serum Markers for the Early Detection of Familial Pancreatic Cancer. *Translational Oncology*, 6, 99-103.
- Smith, R. A., Porteous, C. M., Gane, A. M. a Murphy, M. P. (2003). Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 5407-12.
- Son, J., Lyssiotis, C. A., Ying, H., Wang, X., Hua, S., Ligorio, M., et al. (2013). Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature*, 496, 101-5.
- Strauss, M. H., G.; Schröder, R. R.; Kühlbrandt, W. (2008). Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO*, 27, 1154-1160.
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., et al. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, 121, 1043-57.
- Szabo, I. a Zoratti, M. (2014). Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiological reviews*, 94, 89.
- Tan, A. S., Baty, J. W., Dong, L. F., Bezawork-Geleta, A., Endaya, B., Goodwin, J., et al. (2015). Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. *Cell Metab*, 21, 81-94.
- Tomlinson, I. P., Alam, N. A., Rowan, A. J., Barclay, E., Jaeger, E. E., Kelsell, D., et al. (2002). Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet*, 30, 406-10.
- Trachootham, D., Alexandre, J. a Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*, 8, 579-591.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. And Yoshikawa, S (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, 272, 1136-1144.
- Van Lier, M. G., Wagner, A., Mathus-Vliegen, E. M., Kuipers, E. J., Steyerberg, E. W. a Van Leerdam, M. E. (2010). High cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and surveillance recommendations. *Am J Gastroenterol*, 105, 1258-1265.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. a Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324, 1029-33.
- Vaquero, E. C., Edderkaoui, M., Pandol, S. J., Gukovsky, I. a Gukovskaya, A. S. (2004). Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem*, 279, 34643-54.
- Vermes I, H. C., Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184, 39-43.
- Viale, A., Pettazoni, P., Lyssiotis, C. A., Ying, H., Sanchez, N., Marchesini, M., et al. (2014). Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature*, 514, 628-32.
- Vinothkumar, K. R., Zhu, J. a Hirst, J. (2014). Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature*, 515, 80-4.
- Walker, J. E. (2013). The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem Soc Trans*, 41, 1-16.

- Walker, J. E., Fearnley, I.M., Lutter, R., Todd, R.J. And Runswick, M.J. (1990). Structural Aspects of Proton-Pumping ATPases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 326, 367-378.
- Wallace, D. C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*, 39, 359-407.
- Wang, Y. T., Gou, Y. W., Jin, W. W., Xiao, M. a Fang, H. Y. (2016). Association between alcohol intake and the risk of pancreatic cancer: a dose-response meta-analysis of cohort studies. *BMC Cancer*, 16, 212.
- Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123, 309-315.
- Watanabe, C. (1918). Studies in the metabolic changes induced by administration of guanidine bases. *J. biol. Chem.*, 33, 253.
- Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W. W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., et al. (2010). Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 8788-8793.
- Würth, R., Pattarozzi, A., Gatti, M., Bajetto, A., Corsaro, A., Parodi, A., et al. (2013). Metformin selectively affects human glioblastoma tumor-initiating cell viability: A role for metformin-induced inhibition of Akt. *Cell Cycle*, 12, 145-156.
- Yachida, S., Jones, S., Bozic, I., Antal, T., Leary, R., Fu, B., et al. (2010). Distant Metastasis Occurs Late during the Genetic Evolution of Pancreatic Cancer. *Nature*, 467, 1114-1117.
- Yan, B., Stantic, M., Zabalova, R., Bezawork-Geleta, A., Stapelberg, M., Stursa, J., et al. (2015). Mitochondrially targeted vitamin E succinate efficiently kills breast tumour-initiating cells in a complex II-dependent manner. *BMC Cancer*, 15, 401.
- Zeth, K. a. T., M. (2010). Porins in prokaryotes and eukaryotes: common themes and variations. *Biochemical Journal*, 431, 13-22.
- Zhang, J. G., Hong, D. F., Zhang, C. W., Sun, X. D., Wang, Z. F., Shi, Y., et al. (2014). Sirtuin 1 facilitates chemoresistance of pancreatic cancer cells by regulating adaptive response to chemotherapy-induced stress. *Cancer Sci*, 105, 445-54.
- Zhong, H., De Marzo, A. M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D. A., Zagzag, D., et al. (1999). Overexpression of Hypoxia-inducible Factor 1 α in Common Human Cancers and Their Metastases. *Cancer Research*, 59, 5830-5835.